

⑫ 公開特許公報(A) 平2-243633

⑬ Int. Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成2年(1990)9月27日

A 61 K 39/02  
39/085  
39/10  
39/106  
39/108  
39/39

8829-4C  
8829-4C  
8829-4C  
8829-4C  
8829-4C  
8829-4C

審査請求 未請求 請求項の数 8 (全39頁)

⑮ 発明の名称 ワクチン製剤

⑯ 特 願 平1-6759

⑰ 出 願 平1(1989)1月13日

優先権主張 ⑱ 昭63(1988)4月8日 ⑲ 日本(JP) ⑳ 特願 昭63-86693

㉑ 発 明 者 田 村 慎 一 神奈川県横浜須賀町森崎4-1-31  
㉒ 発 明 者 倉 田 毅 東京都府中市四谷1-6-1  
㉓ 発 明 者 相 澤 主 税 神奈川県横浜須賀町湘南鷹取3-21-10  
㉔ 発 明 者 長 峰 隆 神奈川県横浜須賀町池田町5-90-73  
㉕ 出 願 人 北里研究所(社団法人) 東京都港区白金5丁目9番1号  
㉖ 代 理 人 弁理士 小林 和憲 外1名

明 細 書

1. 発明の名称

ワクチン製剤

2. 特許請求の範囲

(1) トキシンまたはそのサブユニットを有効成分とするワクチン製剤。

(2) トキシシンが細菌トキシンである特許請求の範囲第1項記載のワクチン製剤。

(3) 細菌トキシシンがコレラトキシン、ブドウ球菌αトキシン、ブドウ球菌δトキシン、腸炎ビブリオ菌耐熱性溶血トキシンまたは病原性大腸菌腸毒性トキシンである特許請求の範囲第1項記載のワクチン製剤。

(4) トキシシンのサブユニットがBサブユニットである特許請求の範囲第1項記載のワクチン製剤。

(5) ワクチンがインフルエンザワクチン、百日せきワクチン、日本脳炎ワクチン、B型肝炎ワクチン、ロタワクチン、麻しんワクチン、風しんワクチン、おたふくかぜワクチン、麻しん・風しん・おたふくかぜ混合ワクチンまたはマイコプラズマ

ワクチンである特許請求の範囲第1項記載のワクチン製剤。

(6) ワクチンとトキシシンまたはそのサブユニットとの混合比率が1:0.001~1:10.000(重量比)である特許請求の範囲第1項記載のワクチン製剤。

(7) 点鼻ワクチンである特許請求の範囲第1項記載のワクチン製剤。

(8) 注射剤、スプレー剤または経口投与用形態の剤である特許請求の範囲第1項記載のワクチン製剤。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明はワクチン製剤に関する。更に詳しくは本発明はトキシンまたはそのサブユニットを有効成分とするワクチン製剤に関する。

(従来の技術)

ワクチンは、種々の疾病の予防に用いられ、数々の輝かしい成果をあげてきた。しかしながら、ワクチンの副作用や、また効果が充分でないとい

う例も多くあって、その対策が強く望まれている。副作用を軽減するにはワクチン自体の純度を高めることや、その使用量を少なくすることなどがあるが、それにより効果も小さくなるという避けられない問題がある。

(発明が解決しようとする課題)

現在ヒトに使用されているワクチンの多くは、病原体あるいは病原体の一部を取り出し、材料として用いる。従って、病原体を構成する成分や病原体を増強させる媒体の成分がワクチンに混入することは避けられず、これがワクチン接種の際、副作用を引き起こす原因となる。また、免疫賦与に働く抗原部分そのものも多量に接種されると副作用を誘発する場合もある。

このようなことをできるだけ避け、副作用の起こりにくいワクチンに改善することが必要である。

上記のような課題を解決する方法として、ワクチンの接種量を減少することや、接種ルートを変えることなどがある。本発明者は、ワクチンの使用量を減らしても免疫力は減少しないようにす

るため、ワクチンの免疫力を増強させる方法について種々検討した結果、細菌トキシンとくにコレラトキシン、ブドウ球菌 $\alpha$ トキシン、ブドウ球菌 $\delta$ トキシン、肺炎ビブリオ菌耐熱性溶血トキシン、病原大腸菌易熱性トキシン(LT)そのもの、あるいは、それらのサブユニットをワクチンと共に使用することによって、ワクチンの免疫力を増強させることを見出した。また、ワクチンの接種ルートについても検討を行った。

本発明の目的は、ワクチンの使用量を減らすとともに、ワクチンの免疫力を減少させることなく、むしろ免疫力を増強させ得るようにしたワクチン製剤を提供するにある。

(課題を解決するための手段)

上記の如き課題を達成するための本発明のワクチン製剤は、トキシンまたはそのサブユニットを有効成分とするワクチン製剤を提供するにある。

トキシンが細菌トキシンであるワクチン製剤である。

細菌トキシンがコレラトキシン、ブドウ球菌 $\alpha$

トキシン、ブドウ球菌 $\delta$ トキシン、肺炎ビブリオ菌耐熱性溶血トキシンまたは病原性大腸菌易熱性トキシンであるワクチン製剤である。

トキシンのサブユニットがBサブユニットであるワクチン製剤である。

ワクチンがインフルエンザワクチン、百日せきワクチン、日本脳炎ワクチン、B型肝炎ワクチン、ロタワクチン、麻しんワクチン、風しんワクチン、おたふくかぜワクチン、麻しん・風しん・おたふくかぜ混合ワクチンまたはマイコプラズマワクチンであるワクチン製剤である。

ワクチンとトキシンまたはそのサブユニットとの混合比率が1:0.001~1:10.000(重量比)であるワクチン製剤である。

点鼻ワクチンであるワクチン製剤である。

注射剤、スプレー剤または経口投与用形態の剤であるワクチン製剤である。

今、ワクチンとしてインフルエンザワクチンを、細菌トキシンとしてコレラトキシン(CT)およびコレラトキシンBサブユニット(CTB)を例

にとって説明する。

鼻腔内に接種されたワクチンに対する局所免疫調節剤の一つとして、本発明者らは、ビブリオ・コレラ菌の産生する蛋白質トキシン、コレラトキシンに注目した。このトキシンは、小腸の粘膜に作用し、コレラ下痢症を引き起こす。また、このトキシンは、IgA抗体産生を誘導する強い免疫原であるばかりでなく、トキシンと同時に投与された他の蛋白質抗原に対する免疫応答を増強する免疫調節剤としても知られている。これらCTの効果は、CTが腸管細胞に対して細胞内のcAMPレベルを上げる作用によるらしい。この作用は、CTを構成するA、B2つのサブユニットのうち、CTBが細胞膜のGM<sub>1</sub>ガングリオシドと結合し、コレラトキシンAサブユニットが細胞内に入ってアデニシルラーゼを活性化することによっている。また、作用メカニズムは明らかでないが、CTの免疫増強作用は、それ自身に毒性がないと考えられているCTBと他の蛋白質抗原を腸内に同時に投与した時にも起こることが示されており、

有望な局所免疫応答の増強剤であるように思われる。これらの事実は、CTおよびCTBが、腸粘膜においてばかりでなく、呼吸粘膜においても、より毒性が少ない形で、共存する抗原に対する局所免疫応答を増強する可能性を示唆している。

本発明者らは、マウスにおいて鼻腔内接種したHAワクチンに対する局所および血中抗体産生におよぼすCTおよびCTBの増強効果を検討した。また、ワクチン効果の増強剤としてのCTおよびCTBの有用性について検討した。

#### 鼻腔内接種されたHAワクチンに対する免疫応答のCTBによる増強

マウスの鼻腔に接種されたHAワクチン(A/山形)に対する抗体産生と、それに及ぼすCTBの影響を検討した。同時に、鼻腔内接種の結果を、他のルートでの結果と比較した。抗体産生は、HAワクチン(2μg)を単独あるいはCTB(5μg)と共にマウス鼻腔内に滴下(あるいは腹腔、皮下に注射)後、4週目のマウスの血清および鼻腔洗浄液中の、それぞれHI抗体および抗HAワ

クチン-IgA、抗CTB-IgAを測定することによって決定した。第2表の結果から明らかのように、HAワクチンを単独で鼻腔内接種したときには、低いレベルのHI抗体しか検出されない。しかし、CTBと共に投与すると血中のHI抗体が、単独の場合よりも64倍高く検出された。また、鼻汁中にもHA-IgA、抗CTB-IgAが検出された。一方、腹腔や皮下接種した時、ワクチンのみの接種群でも血中に高いHI抗体が検出され、CTB共存下では更に4~8倍高い産生が見られた。しかし、鼻汁中には抗HA-IgAも抗CTB-IgAも共に殆ど検出されなかった。以上の結果は、CTBが、共存するHAワクチンに対する抗体産生を増強することを示している。また、鼻腔ルートでHAワクチンをCTBとともに接種した時にのみ局所の抗HA-IgA産生が増強されることを示している。第2表には示されていないが、血清中には抗HA-IgAは検出されなかった。

#### HAワクチンとCTBの鼻腔内接種後の一次抗

#### 体産生の経過

鼻腔ルートでHAワクチン(A/山形; 2μg)とCTB(5μg)を接種し、マウスにおける抗体産生の経過を検討した。第1図に示されるように、CTBの存在下で血中のワクチンに対するHI抗体産生は、1週目から2週目にかけて急速に増加し、その後も4週目までゆっくりと増加し続けた。鼻汁中の全IgA量は、接種1週目から2週目にかけて非接種マウスの全IgA量の6倍位まで急速に増加し、最大レベルに達した。また、その中に含まれている抗HA-IgAは、1週目以後4週目までゆっくり増加し続けた。したがって、HAワクチンに対する局所の抗体は、CTBとワクチンを接種後、2週目位から検出されるようになる。

CTBのHAワクチンに対する一次および二次抗体産生増強作用とHAワクチン接種量の影響  
CTB(5μg)とHAワクチン(A/山形)をマウスの鼻腔内に接種し抗体産生とワクチンの接種量の関係を検討した。抗体産生は、CTBと

ワクチン接種後4週目に一次抗体産生を、4週目にワクチン(2μg)のみをさらに二次接種して後2週目に二次抗体産生を検討した。第3表に示されているように、一次応答に関しては、ワクチンのみを接種した場合、接種量が8μgになっても低いレベルの抗体産生しか見られなかった。一方、CTBとワクチンを接種した場合には、接種量が0.03μgでも抗体産生が認められ、その増量に伴って血中のHI抗体、局所のHI-IgAは共に増加した。また、二次応答に関しては、ワクチンのみを一次接種したグループでも、一次接種量が増すにつれて、HI抗体、抗HA-IgAの増加がみられた。一方、CTBとワクチンを一次接種したグループでは、ワクチンの一次接種量によらず非常に高いHI抗体と抗HA-IgAの産生を示した。特に、局所の抗HA-IgA量は一次応答の数十倍に達した。これらの結果は、一次接種に用いられたCTBが、共存するワクチンの量に関係なく二次接種による抗体産生を非常に強く誘導する作用があることを示している。

アジュバント作用を示すことが、ワクチン接種後の感染の増進に対して、H A ワクチンに対するメモリー効果を強く誘導する作用があることを示している。

#### CTB の H A ワクチンに対する免疫応答増進作用と感染抵抗性

CTB により H A ワクチンに対する免疫応答は増強されるが、インフルエンザウイルス感染に対する抵抗が増加されるかどうかを、マウス馴化インフルエンザウイルス PR 8 株を用いて検討した。PR 8 株ウイルス H A ワクチン (1.5  $\mu$ g) と CTB (5  $\mu$ g) を、マウスの鼻腔内に接種し、4 週目に PR 8 株ウイルスを感染させた。感染 3 日後のマウス肺内のウイルス量を感染抵抗性の指標として測定した。その結果、第 4 表に示されるように、ワクチンと CTB を共に接種され、接種後 4 週目に高い血中の H I 抗体と局所の抗 H A - I g A 抗体を産生しているマウスでは、肺中にウイルスが検出されず、インフルエンザウイルスに全く侵されていないことを示していた。

ウイルス感染後、3 日目の肺内ウイルス量が感

染抵抗性の指標になり得ることを確かめるために、H A ワクチンを CTB とともにマウスに接種し、4 週目に PR 8 株ウイルスを感染させ、感染後のマウス肺内ウイルス量の変動を検討した。結果は、第 2 図に示されているように、感染 3 日後に肺内ウイルスが  $< 10^{2.5}$  のマウスでは感染 1 日目で既に肺内にウイルスが検出されず、その後、少なくとも 8 日後までその状態が持続し生存し続けた。一方、ワクチンに対する抗体産生が殆どみられなかった対照群では 1 日目に肺内のウイルス量の増加が見られ、3 日目に最大ウイルス量に達した。これら対照群のマウスは感染 6 日目から死亡、非免疫マウスでは 8 日目には 9 匹中 6 匹の死亡が確かめられた。また生存したマウス 3 匹も肺内の病変が強く、数日以内に死亡するものと判断された。CTB のみ、あるいは H A ワクチンのみを接種したマウスのグループでも非免疫マウスの場合と同様の結果であった。従って、ウイルス感染 3 日後の肺内ウイルス量が感染抵抗性の指標になることが明らかであった。

#### CTB あるいは CT の H A ワクチンに対する免疫応答の増強と感染抵抗性

PR 8 株ウイルス H A ワクチン (1.5  $\mu$ g) を様々な濃度の CT あるいは CTB と共に鼻腔内に接種し、4 週後の抗体産生と、PR 8 株ウイルス感染に対する抵抗性を検討した。その結果、第 5 表に見られるように、CTB が 0.05  $\mu$ g でも多少の感染抵抗性を示したが、5  $\mu$ g を添加した時に完全な防御を示した。また、感染抵抗性の増大は、ワクチンと CTB 接種 4 週目の局所の I g A の増加や血中の H I 抗体産生の増加と平行しているように思われる。一方、CT は 0.05  $\mu$ g 以上のどの濃度でも完全な感染防御をし、これらの条件下では CT 濃度の増加に伴って、血中の H I 抗体や局所 I g A 抗体の増加が認められた。このことは、CT は CTB の方が 1/10 以下の濃度でも、完全な感染防御に必要な血中の H I 抗体や局所の H A - I g A の産生を促進することができることを示唆している。副作用に関する問題がなければ、CTB よりも CT の方が低濃度で有効

なアジュバントとして使えると思う。またこの実験結果から、PR 8 株ウイルス感染に対する完全な防御のためには、マウス血中に H I 抗体が抗体価で 32 倍以上、鼻汁中に局所抗体が抗 H A - I g A にして 2 単位以上存在することが必要であることを示唆している。各種細菌トキシンのアジュバント作用は第 1 表に示す通りである。

第 1 表

トキシンの種類	接 種 量		抗 体 産 生 HI (2°)	生残マウス数
	トキシソ ( $\mu$ g/マウス)	インフルエンザHA ( $\mu$ g/マウス)		
ブドウ球菌αトキシソ	0.5	1.5	10.0 ± 1.7	5/5
ブドウ球菌δトキシソ	5	1.5	<4	5/5
	0.5	1.5	<4	5/5
肺炎ヒブリオ菌計 熱性溶血トキシソ	5	1.5	11.5	5/5
	0.5	1.5	9.8 ± 1.1	5/5
肺炎大腸菌弱熱性 トキシソ (LT)	5	1.5	11.8 ± 0.4	5/5
	0.5	1.5	10.8 ± 2.2	5/5
対 照	0	1.5	<4	0/5
			<4	0/5

表 2 差 コレラトキシソBサブユニット (CTB) によるインフルエンザHAワタチソ (A/山形)  
に対する抗体応答の増強と接種ルートによる増強効果の比較

グループ No.	接 種 条 件			接種4週間後の抗体応答		
	接種材料		接種ルート	血中 HI抗体価 (2°)	局 所 (鼻汁)	
	HAワタチソ (2 $\mu$ g)	CTB (5 $\mu$ g)			抗HA-IgA (単位)	抗CTB-IgA (単位)
1	-	-	-	<2°	<0.2	<0.2
2	-	+	鼻腔	<2°	<0.2	8.3 ± 0.3
3	+	-	鼻腔	2°	<0.2	<0.2
4	+	+	鼻腔	2 <sup>11</sup>	3.3 ± 0.3	7.4 ± 1.1
5	+	-	腹腔	2°	<0.2	<0.2
6	+	+	腹腔	2 <sup>11</sup>	<0.2	0.2
7	+	-	皮下	2°	<0.2	<0.2
8	+	+	皮下	2 <sup>12.5 ± 0.7</sup>	<0.2	0.2

第 3 表 CTBによるHAワクチンに対する一次および二次抗体応答の増強とHAワクチン接種量の影響

グループ No.	一次 接種接種材料		一次接種4週間後 の抗体応答		二次接種(2μg HAワクチン) 8週間後の抗体応答	
	HA (μg)	CTB (5 μg)	血中 H1抗体 (単位)	局所(鼻汁) 抗HA-IgA (単位)	血中 H1抗体 (単位)	局所(鼻汁) 抗HA-IgA (単位)
1	-	-	<2 <sup>a</sup>	<0.2	2 <sup>a</sup>	<0.2
2	-	+	<2 <sup>a</sup>	<0.2	2 <sup>a,b</sup> ± 0.7	1.2 ± 1.2
3	0.03	-	<2 <sup>a</sup>	<0.2	2 <sup>a</sup>	2.9 ± 1.6
4	0.5	-	<2 <sup>a</sup>	<0.2	2 <sup>a,b</sup> ± 0.7	2.6 ± 0.6
5	8	-	2 <sup>a</sup>	0.3 ± 0.1	2 <sup>a,b</sup> ± 0.7	4.5 ± 2.1
6	0.03	+	2 <sup>a</sup>	0.7 ± 0.3	2 <sup>a,b</sup> ± 0.7	6.0 ± 4
7	0.5	+	2 <sup>a,b</sup> ± 0.7	2.5 ± 0.4	2 <sup>a,b</sup> ± 0.7	11.3 ± 2.7
8	8	+	2 <sup>a,b</sup> ± 0.7	4.6 ± 0.3	2 <sup>a,b</sup> ± 0.7	7.8 ± 1.0

第 4 表 CTBによるHAワクチン(PR8株)に対する抗体応答の増強と感染抵抗性

グループ No.	接種接種材料		接種4週間後の抗体応答		感染3日後の マウス肺内ウ イルス量 EID <sub>50</sub> (10 <sup>-4</sup> )	罹患率 (%)
	HAワクチン (1.5 μg)	CTB (5 μg)	血中 H1抗体 (2 <sup>a</sup> )	局所(鼻汁) 抗HA-IgA (単位)		
1	-	-	<2 <sup>a</sup>	<0.2	10 <sup>a,b</sup> ± 0.5	5/5 (100)
2	-	+	<2 <sup>a</sup>	<0.2	10 <sup>a,b</sup> ± 0.5	5/5 (100)
3	+	-	<2 <sup>a</sup>	<0.2	10 <sup>a,b</sup> ± 0.5	5/5 (100)
4	+	+	2 <sup>a,b</sup> ± 0.5	4.6 ± 0.7	10 <sup>a,b</sup>	0/5 (0)

第 5 表 CTBあるいはCTによるHAワクチン (PR8株) に対する抗体応答の増強と感染抵抗性

グループ No.	鼻接種材料		接種4週間後の抗体応答			感染3日後の ウス肺内ウイルス 量 (ED <sub>50</sub> ) (10 <sup>-3</sup> )
	HAワクチン (1.5 μg)	CTB (CT) (μg)	血中 HI抗体価 (2 <sup>+</sup> )	局所 (鼻汁) 抗HA-IgA 抗CTB-IgA (単位) (単位)		
1	-	-	<2 <sup>+</sup>	<0.2	<0.2	10 <sup>2.8</sup>
2	-	CTB (5)	<2 <sup>+</sup>	<0.2	6.2±1.3	10 <sup>2.7</sup>
3	+	-	<2 <sup>+</sup>	<0.2	<0.2	10 <sup>2.7</sup>
4	+	CTB (0.05)	<2 <sup>+</sup>	0.5	<0.2	10 <sup>2.8</sup>
5	+	CTB (0.5)	2 <sup>+</sup> ±2.7	1.2±0.9	1.5±1.0	10 <sup>2.8</sup>
6	+	CTB (5)	2 <sup>+</sup> ±2.7	4.6±0.7	3.7±0.6	10 <sup>2.8</sup>
7	+	CT (0.05)	2 <sup>+</sup>	2.0±0.8	<0.2	10 <sup>2.8</sup>
8	+	CT (0.5)	2 <sup>+</sup>	3.2±0.6	0.6±0.6	10 <sup>2.8</sup>
9	+	CT (5)	2 <sup>+</sup> ±2.7	3.1±0.1	2.7±0.1	10 <sup>2.8</sup>

以上のことより次のことが明らかになった。

(1) CTおよびCTBは共存するインフルエンザ・HAワクチンに対する抗体産生を増強する。

(2) ワクチンをCTBとともに鼻腔ルートで接種すると、血中のHI抗体産生と共に局所 (鼻汁) の抗HA-IgA産生も増強される。一方、腹腔や皮下ルートで接種した場合には、局所のHA-IgA産生は殆ど見られない。しかし、血中には高いHI抗体産生が出現する。すなわち、CTBは接種ルートに関係なく抗体産生増強作用がある。この事実は後に述べるCT、CTB、ブドウ球菌α毒素、ブドウ球菌βトキシン、腸炎ビブリオ菌耐熱性溶血毒素または病原大腸菌易熱性トキシン毒素と百日ぜきワクチン、B型肝炎ワクチン、日本脳炎ワクチン、麻疹ワクチン、風しんワクチン、おたふくかぜワクチン、麻疹・風しん・おたふくかぜ混合ワクチン、ロタワクチン、マイコプラズマワクチンと混合投与するとき、これらワクチン単独投与より更に高い抗体価を得ることができることにつながる。換言すればトキシンお

よびそれらのサブユニットを使用することによって、ワクチン量を減少させることができ、副作用を軽減することができる。

(3) ワクチンとCTBを鼻腔ルートで接種すると、局所の抗HA-IgAは2週目から4週目までその産生量が増加し続ける。

(4) ワクチンとCTBを鼻腔ルートで一次接種した時の4週目の抗体産生は、接種に用いたワクチンの量に比例して増加する。

(5) ワクチンとCTBをマウス鼻腔ルートで一次接種した後、4週目にワクチンのみを同一ルートで二次接種すると、その2週後の二次抗体産生は、一次接種に用いたワクチンの量に拘らず非常に高くなる。即ち、CTBは共存する一次接種に用いたワクチンが低濃度の場合でも、ワクチンに二次刺激に対する非常に高い抗体産生を誘導する作用があった。したがって、CTBは、強いメモリー効果を誘導する作用がある。

(6) ワクチンとCTBを鼻腔ルートで接種多量の血清抗体や局所HA-IgAを産生している接種

後4週目のマウスでは、インフルエンザに対する感染が成立しない。本発明者らが用いた条件では、血中のHI価が32倍以上、局所抗体が2単位以上を有するマウスでは、PR8ウイルス感染に対する防御が成立した。

ワクチンと共に鼻腔ルートで接種されたとき、完全なウイルス感染防御に要する抗体産生誘導のために必要なCTBの量は、 $\mu\text{g}$ のオーダーであった。一方、CTの場合、CTBの1/10以下の濃度でも完全な感染防御に必要な抗体産生を誘導した。

本発明において使用されるトキシンあるいはそのサブユニット、例えばCTまたはCTBは、公知のCTおよびCTB調製法に従って調製することができるが、いずれも市販されているので、それを用いることができる。CTは大量に動物に投与すると毒性を現すが、少量であれば鼻腔内（あるいは腹腔内）では問題がない。CTBはCTに比べて毒性が遙かに少なく鼻腔内投与では全く問題ない。更に、ブドウ球菌 $\alpha$ トキシン、ブド

ウ球菌 $\delta$ トキシン、腸炎ブドウ球菌耐熱性溶血トキシン、病原大腸菌腸熱性トキシンが挙げられる。

ワクチンとしては、インフルエンザワクチン、百日ぜきワクチン、B型肝炎ワクチン、日本脳炎ワクチン、麻しんワクチン、風しんワクチン、おたふくかぜワクチン、麻しん・風しん・おたふくかぜ混合ワクチン、ロタワクチン、マイコプラズマワクチン等の各種ワクチンが挙げられる。これらのワクチンは、通常のこれらワクチン製造法に従って製造可能である。各種ワクチンの製造法、性質を概略すると以下の通りである。

インフルエンザワクチン；発育鶏卵で増殖させたウイルスをエーテル、界面活性剤などで分解精製して得たあるいは遺伝子操作や化学合成によって得た血球凝集素（HA）、ノイラミニデース（NA）、核蛋白質（NP）、マトリックス蛋白質（M）あるいはその一部などを含むワクチン。

百日ぜきワクチン；百日ぜき菌を培養した培養液あるいは菌体より塩析、超遠心などを用いて抽出し、ホルマリンで無毒化したもの、または、遺

伝子操作や化学合成によって得た百日ぜき菌毒素（PT）、血球凝集素（FHA）、K-凝集素、あるいは、その一部などを含むワクチン。

日本脳炎ワクチン；マウス内で増殖したウイルスを超遠心あるいはエチルアルコールなどを用いてウイルス粒子を精製した後、ホルマリンで不活化したもの、あるいは遺伝子操作や化学合成などによって得た抗原蛋白質。

B型肝炎ワクチン；B型肝炎キャリアの血液を原材料とし、塩析、超遠心を用いてHBs抗原を分離精製したもの、あるいは遺伝子操作や化学合成などによって得た抗原部位。

麻しんワクチン；ニワトリ胎児細胞などの培養細胞、あるいは、発育鶏卵で増殖させたウイルス、あるいは、その一部、または、遺伝子操作や化学合成によって得た感染防御抗原を含むワクチン。風しんワクチン；ニワトリ胎児細胞などの培養細胞、あるいは、発育鶏卵で増殖させたウイルス、あるいは、その一部、または、遺伝子操作や化学合成によって得た感染防御抗原を含むワクチン。

おたふくかぜワクチン；家兎細胞などの培養細胞あるいは発育鶏卵で増殖させたウイルス、または、その一部、あるいは、遺伝子操作や化学合成によって得た感染防御抗原を含むワクチン。

麻しん・風しん・おたふくかぜ混合ワクチン；麻しん・風しん・おたふくかぜワクチンを混合したワクチン。

ロタワクチン；MA104細胞など培養細胞で増殖させたウイルスまたは患者の糞便中より得たウイルスあるいは遺伝子操作または化学合成など、または、その一部により得た感染防御抗原を含むワクチン。

マイコプラズマワクチン；マイコプラズマ液体培養地で増殖したマイコプラズマ、または、その一部、あるいは、遺伝子操作や化学合成などにより得られた感染防御抗原を含むワクチン。

上記ワクチンは液状または粉末状で供される。

勿論、これらワクチンはトキシンまたはそのサブユニットと共に投与されるときは液状の方が鼻腔内投与（鼻腔内スプレー、滴下、塗布など）や

注射の場合に通していることはいうまでもない。さらに、鼻腔内投与の場合は、粉末スプレー方式も可能である。投与量は、マウスの場合、鼻腔内で  $5 \mu\text{L} \sim 50 \mu\text{L}$ 、ヒトの場合は鼻腔内投与、注射いずれも  $0.1 \sim 0.5 \text{ mL}$  が適当である。これらの量は勿論適宜変更し得ることはいうまでもない。

ワクチンとトキシンまたはそのサブユニットの混合比率は、 $1:0.001 \sim 1:10.000$  (重量比) であり、ワクチンの種類に応じたヒトの投与量に促さばよい。

本発明のワクチン製剤は、上記ワクチンにトキシンまたそのサブユニットを所定の量比で混合することにより調製される。調製は厳密に無菌的に行わなければならないことはいうまでもなく、それぞれの原材料も完全に無菌的でなければならない。勿論、ワクチン作用以外に必要なバイロジェンやアレルギー源となるような夾雑タンパクは可能な限り除去されねばならない。

本発明のワクチン製剤は、ワクチン自体とトキ

シンまたはそのサブユニットをそれぞれ別々に調製、製剤化しておき、用時に混合するか、または別々に同時に投与するという方法によっても、効果を発揮させることができる。

以下参考例としてインフルエンザワクチンとCTまたはCTBを混合した本発明のワクチン製剤の効果を示した実験例を挙げる。

#### 参考例

##### 動物：

Balb/c、6～8週令の雌マウスを用いた。

##### HAワクチン：

精製ウイルスよりエーテル処理によって脂質成分を除去したものをHAワクチンとして用いた。このHAワクチン中にはHA成分が約30%含まれており、第2表～第5表に示す結果中のワクチンの接種量は、その中のHA量に換算して表記した。

##### CTおよびCTB

コレラトキシン (CT) とそのコレラトキシンBサブユニット (CTB) は共に市販品 (米國、

シグマ社製) を購入して用いた。この実験で用いられたCTBには、SDSポリアクリルアミドゲルの電気泳動上でコレラトキシンAサブユニットの混入は認められなかった。

##### 接種ルートおよび接種法：

接種材料はHAワクチンあるいはアジュバントをリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で適当濃度に希釈し調製した。鼻腔ルートでの接種は、マウスをアモバルビタルナトリウムで麻酔後、左側鼻腔にマイクロピペットで  $20 \mu\text{L}$  の接種材料を滴下することによって行った。皮下ルートからの接種は麻酔条件下でマウス背部皮下に  $100 \mu\text{L}$  の接種材料を注射することにより行った。また、腹腔からの接種は、 $100 \mu\text{L}$  の接種材料を注射することによって行った。

##### 血液及び鼻汁の回収：

血液はエーテル麻酔条件下で、マウス的心臓より全採血によって、回収した。鼻汁は、放血後のマウスの左右の鼻孔より  $1 \text{ mL}$  のPBSを2回ずつ逆流することによって回収した。

##### 赤血球凝集抑制 (HI) 抗体価の測定：

HI価測定のための血清は先ずRDE (Receptor Destroying Enzyme) によって血清中の非特異的赤血球凝集抑制物質を除去した。次に、血清はU型マイクロタイタープレート上で2倍シリーズの希釈をし、16HAユニットのウイルスとともに混合し、30分間室温放置後、鶏赤血球を加えることによって、分析した。結果は、室温で1時間放置後、決定した。

##### 抗HA IgA、抗CTB IgA、全IgA量の測定：

血清および鼻汁中の抗HA-IgA抗CTB IgA、全IgA量は酵素免疫測定法 (ELISA) によって測定した。抗HA-IgAや抗CTB-IgAの定量の際には、コーティング緩衝液に懸濁したHAワクチン ( $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) やCTB ( $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ )  $50 \mu\text{L}$  で、先ず96穴のEIAプレート (half-area, Costar, Cambridge, MA) 各孔 (well) をコートした。室温に2時間放置後、PBS

牛血清アルブミン (BSA) (及び 0.1% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) を含む PBS、100  $\mu$ l で各孔をコートした。4℃ に一昼夜放置後、PBS-tween で洗浄し、各孔に血清あるいは鼻汁試料を 50  $\mu$ l づつ入れた。室温に 2 時間放置後、PBS-tween で洗浄し、次に各孔に 50  $\mu$ l づつ、PBS-tween で希釈したアルカリホスファターゼ結合の山羊抗マウス IgA ( $\alpha$  の種特異性、1:1000、米國、ザメット ラボ社製) を加えた。室温に 1 時間放置後、PBS-tween で洗浄後、各孔に 100  $\mu$ l、pH 9.8 で 10% ジェタノールアミンを含む緩衝液に懸濁した p-ニトロフェニルフェート (1mg/ml; シグマ社製) を加えた。室温で 20~30 分間放置後、発色を S&W オートリッド (モデル、BR-8000、三光純薬社製) を使って OD<sub>490</sub> で測定した。検量線は、プレート毎に作り、各試料の値は、S&W オートリッドに内蔵されている二次の logit-log 方式によって回帰

では非免疫マウスの 90% 以上が 14 日目以内に死亡するか、あるいは肺内にコンソリデーションを形成した。

#### 肺のウイルス量の測定:

感染後 3 日目のウイルスから肺を摘出し、乳鉢で粉砕し、PBS で 10% 乳剤とした。それを 2500 回転で遠心した上清を、10 倍倍率希釈後、それぞれの希釈液を孵化鶏卵 (5 個) に接種した。卵内でのウイルスの増殖は、胚尿液の赤血球凝集によって決定し、感染を示した卵に、接種した肺乳剤の最低希釈の価を EID<sub>50</sub> により決定し、マウスの肺ウイルス価とした。肺ウイルス価は平均値 ( $\pm$ SD) 表現した。実験によっては、1 群 5 匹のマウス肺をプールして肺乳剤を作り、その肺ウイルス価を決定した。

#### 罹患率:

1 群 5 匹のマウスの 10% 肺乳剤中に、 $>10^4$  のウイルスが検出されたマウスの数によって罹患率を示した。

#### 統計処理:

した検量線に照らして求めた。抗 H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> IgA 定量の標準液としては、HA ワクチンを鼻腔内より 2 週間毎に 5 回接種したマウスの鼻汁を 8 単位と決めて用いた。また、抗 CTB-IgA 定量の標準液としては、CTB (5  $\mu$ g) を鼻腔内より接種し 4 週目のマウスの鼻汁 (1gA 量の多かったもの) を 8 単位と決めて使用した。全 IgA 量の定量には、先ず 1  $\mu$ g/ml の山羊抗マウス IgA を各孔に 50  $\mu$ l づつ加える操作を除いて同様の操作を行った。全 IgA 定量の標準液としては、マウスの精製 IgA ミエローマ (米國、マイルス ラボラトリーズ社製) を用いた。

#### PR8 株ウイルスによるマウスの感染:

マウスをアモバルビタルナトリウムで麻酔し、ウイルスの 0.01% BSA を含む懸濁液をマウス左側鼻腔内に 20  $\mu$ l 滴下することにより、感染させた。PR8 株ウイルスは、フェレットで 148 代、マウスで 596 代、孵化鶏卵で 72 継代した感染価  $10^{6.5}$  の胚尿液原液を、5,000~10,000 倍希釈して用いた。この感染条件

生体内感染実験における感染防御能の有意差は、Student's test によって検定された。

以下、本発明の実施例について詳細に説明するが、本発明は何らこれのみに限定されるものではない。

#### 〔実施例〕

##### 実施例 1

#### インフルエンザ HA ワクチン-CTB 製剤 (点鼻剤の調製)

インフルエンザ HA ワクチン (1mg HA/ml) とリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過した CTB と混合し、1ml 中のインフルエンザ HA ワクチン 1.5~2  $\mu$ l と、CTB 3.5~250  $\mu$ g を含むように調製し、適当な防腐剤および安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、インフルエンザ HA ワクチン-CTB 点鼻剤とした。本品は 10℃ 以下の冷蔵庫に保存する。実験成績は、前述の通り。

### 実施例 2

#### インフルエンザHAワクチン-CTB製剤(注射剤)の調製

インフルエンザHAワクチン(1mg HA/mℓ)とリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過したCTBと混合し、1mℓ中にインフルエンザHAワクチン1.5~2μgと、CTB2.5~250μgを含むように調製し、適当な防腐剤および安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、インフルエンザHAワクチン-CTB注射剤を調製した。本品は10℃以下の冷暗所の保存する。実験成績は、前述の通り。

### 実施例 3

#### B型肝炎ワクチン-CTB製剤(注射剤)の調製

B型肝炎ワクチンとリン酸緩衝液食塩水に溶解し無菌濾過したCTBとを混合し、1mℓ中HBs抗原40μg、蛋白質と、CTBを2.5~250μgを含むように調製し、適当な防腐剤および安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、B型

肝炎ワクチン-CTB注射剤を調製した。本品は10℃以下の冷暗所の保存する。

上記のように調製したB型肝炎ワクチンおよびCTをマウスに接種し、3週間後の血中抗体産生を調べた。

この成績から、B型肝炎ワクチンのみを接種されたマウスでは、2<sup>3.4</sup>単位(受身赤血球凝集反応)であったのに対し、CTを添加したものは10<sup>4.4</sup>単位であり、抗体産生が増強された。

#### B型肝炎ワクチンおよびCTを添加したときの抗体産生の増強

検 体	抗 体 価 P H A
C T	2 <sup>3.4</sup>
無添加	2 <sup>3.4</sup>

抗体価は受身赤血球凝集反応により測定した。

抗体価はマウス5頭の平均値。

### 実施例 4

#### 百日せきワクチン-CTB製剤(点鼻剤)の調製

百日せきワクチンとリン酸緩衝液食塩水に溶解し無菌濾過したCTBとを混合し、1mℓ中に百日せきワクチン14μg蛋白質素と、CTBを2.5~250μgを含むように調製し、適当な防腐剤および安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、百日せきワクチン-CTB経鼻投与剤を調製した。本品は10℃以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製した百日せきワクチン13μg蛋白質素1mℓに、CTBおよびCTを添加し、マウスの鼻腔内に接種し、さらに4週後に同量のワクチンを追加接種し、抗体産生を調べた。

この成績から、百日せきワクチンのみを接種されたマウスでは、抗PT抗体は、4.1国際単位以下であったのに対し、CTBを添加したものでは、140.3単位、CTを添加したものでは232.5単位と上昇した。抗PHA抗体では、ワクチンのみ

CTB添加、CT添加でそれぞれ2.6単位以下、32.0単位以下、43.9単位であり、CTBあるいはCTを添加したものは、ワクチンのみを接種した場合に比べ、著しく抗体産生が増強された。

#### 百日せきワクチンにCTおよびCTBを添加したときの抗体産生の増強

検 体	抗 体 価	
	抗 P T	抗 P H A
C T	232.5	43.9
C T B	140.3	32.0
無添加	<4.1	<2.6

抗体価はマウス5頭の平均値

抗体価はELISA国際単位

# 日本脳炎ワクチン-CTB製剤(注射剤)の調製

日本脳炎ワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過したCTBとを混合し、1ml中に日本脳炎 $10^{7.0}$ PFU相当量の不活化ウイルス粒子と、CTBを0.1~0.5 $\mu$ gを含むように調製し、適当な防腐剤および安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、日本脳炎ワクチン-CTB注射製剤を調製した。本品は10℃以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製した日本脳炎ワクチンおよびCTBあるいはCTを、1週間隔で2回マウスに接種し、血中の抗体量をみた。

その成績から、日本脳炎ワクチンのみを接種した場合に産生される中和抗体価は $10^{1.8}$ であったのに対し、CTB添加、CT添加は、それぞれ $10^{2.2}$ 以上、 $10^{2.8}$ 以上であり、CTB、CTを添加した場合は、ワクチンのみを接種した場合より著しく抗体産生を増強した。

## 日本脳炎ワクチンにCTおよびCTB添加したときの抗体産生の増強

検 体	添 加 濃 度	中和抗体価 10 <sup>°</sup>
C T	0.05 $\mu$ g/HOUSE	3.39
	0.5 $\mu$ g	3.20
	5.0 $\mu$ g	3.52
C T B	0.05 $\mu$ g/HOUSE	2.58
	0.5 $\mu$ g	2.70
	5.0 $\mu$ g	3.39
無添加		1.88

抗体価はマウス10頭のプール血清の抗体価

# 実施例 6

## 麻しんワクチン-CTB製剤(点鼻剤)の調製

麻しんワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過したCTBとを混合し、1ml中に麻しんワクチン20 $\mu$ g相当量のウイルス粒子と、CTBを5 $\mu$ gを含むように調製し、適当な安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、麻しんワクチン-CTB点鼻製剤を調製した。本品は10℃以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製した麻しんワクチンおよびCTBを3週間隔で2回マウスに投与し、血中の抗体産生をみた。

その成績から麻しんワクチンのみを投与した場合に産生されるELISA抗体価は0.144であったのに対し、CTB添加ワクチンは、0.209以上であり、CTBを添加した場合は、ワクチンのみを接種した場合より著しく抗体産生を増強した。

## 麻しんワクチンにCTBを添加したときの抗体産生の増強

接 種 量		抗体産生 ELISA 価
抗 原	CTB	
麻しんワクチン20 $\mu$ g	5 $\mu$ g	0.21
対 照 20 $\mu$ g	5 $\mu$ g	0.144

# 実施例 7

## 風しんワクチン-CTB製剤(点鼻剤)の調製

風しんワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過したCTBとを混合し、1ml中にワクチン3 $\mu$ g相当量のウイルス粒子と、CTBを5 $\mu$ gを含むように調製し、適当な安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、ワクチン-CTB点鼻製剤を調製した。本品は10℃以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製した風しんワクチンおよびCTBを3週間隔で2回マウスに投与し、血中の抗体産生をみた。

その成績からワクチンのみ投与した場合に產生されるELISA抗体価は0.095であったのに対し、CTB添加ワクチンは、0.920以上であり、CTBを添加した場合は、ワクチンのみを接種した場合より著しく抗体產生を増強した。

風しんワクチンにCTBを添加したときの抗体產生の増強

接 種 量		抗体產生 ELISA 価
抗 原	CTB	
風しんワクチン 20 $\mu$ g	5 $\mu$ g	0.920
対 照 20 $\mu$ g	0 $\mu$ g	0.095

実施例 8

おたふくかぜワクチン-CTB製剤(点鼻剤)の調製

おたふくかぜワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解

し無菌濾過したCTBとを混合し、1ml中にワクチン20  $\mu$ g相当量のウイルス粒子と、CTBを5  $\mu$ gを含むように調製し、適当な安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、ワクチン-CTB点鼻剤を調製した。本品は10℃以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製したワクチンおよびCTBを3週間隔で2回マウスに投与し、血中の抗体產生をみた。

その成績からワクチンのみを投与した場合に產生されるELISA抗体価は0.028であったのに対し、CTB添加ワクチンは、0.045以上であり、CTBを添加した場合は、ワクチンのみを接種した場合より著しく抗体產生を増強した。

おたふくかぜワクチンにCTBを添加したときの抗体產生の増強

接 種 量		抗体產生 ELISA 価
抗 原	CTB	
おたふくかぜワクチン 20 $\mu$ g	5 $\mu$ g	0.05
対 照 20 $\mu$ g	0 $\mu$ g	0.028

実施例 9

麻疹・風しん・おたふくかぜ混合ワクチン-CTB製剤(点鼻剤)の調製

麻疹・風しん・おたふくかぜ混合ワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過したCTBとを混合し、1ml中に各々のワクチン7  $\mu$ g、1  $\mu$ g、7  $\mu$ g相当量のウイルス粒子と、CTBを5  $\mu$ gを含むように調製し、適当な安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、麻疹・風しん・おたふくかぜ混合ワクチン-CTB点鼻剤を調製した。本品は1

0℃以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製したワクチンおよびCTBを3週間隔で2回マウスに投与し、血中の抗体產生をみた。

その成績からワクチンのみを投与した場合に產生されるELISA抗体価は麻疹・風しん・おたふくかぜの各々は、0.14、0.09、0.15であったのに対し、CTB添加ワクチンは、各々0.29、0.30、0.24以上であり、CTBを添加した場合は、ワクチンのみを接種した場合より著しく抗体產生を増強した。

麻疹・風しん・おたふくかぜ混合ワクチンにCTBを添加したときの抗体產生の増強

接 種 量		抗体産生 E L I S A 価
抗 原	C T B	
麻しんワクチン 7 $\mu$ g	5 $\mu$ g	麻しん 0.29
風しんワクチン 7 $\mu$ g		風しん 0.30
おたふくかぜ ワクチン7 $\mu$ g		おたふく 0.24
対 照		麻しん 0.14 風しん 0.09 おたふく 0.15

#### 実施例 10

#### ロタワクチン-C T B 製剤 (経口、点鼻剤) の調製

ロタワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾

#### ロタワクチンに C T B を混合したときの抗体産生の増強

接 種 量					抗体産生
抗 原				C T B	
ロ タ ワ ク チ ン	点 鼻 接 種	ワクチン	3.3 μg	5 μg	0. 2 8 1
		対 照	3.3 μg	0 μg	0. 0 8 9
	経 口 接 種	ワクチン	3.3 μg	5 μg	0. 2 2 7
		対 照	3.3 μg	0 μg	0. 0 1 8

過した C T B とを混合し、1 m l 中にワクチン 3.3  $\mu$ g 相当量のウイルス粒子と C T B を 5  $\mu$ g を含むように調製し、適当な安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、ロタワクチン-C T B 経口、点鼻製剤を調製した。本品は 10℃以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製したロタワクチンおよび C T B を 3 週間隔で 2 回マウスに投与し、血中の抗体産生をみた。

その成績から、ワクチンのみを投与した場合に産生される E L I S A 抗体価は、点鼻接種の場合、0.089 であったのに対し、C T B 添加ワクチンは 0.281 であり、また、経口接種の場合、0.018 であったのに対し、C T B 添加ワクチンは 0.227 であり、いずれも C T B を添加した場合は、ワクチンのみを接種した場合より著しく抗体産生を増強した。

#### 実施例 11

#### マイコプラズマワクチン-C T B 製剤 (注射剤) の調製

マイコプラズマワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過した C T B とを混合し、1 m l 中にワクチン  $2.0 \times 10^{10}$  C F U (コロニー形成単位) 相当量のマイコプラズマと、C T B を 10  $\mu$ g を含むように調製し、適当な安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、ワクチン-C T B 注射剤を調製した。本品は 10℃以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製したワクチンおよび C T B を 2 週間隔で 3 回ニワトリに投与し、マイコプラズマ感染攻撃後病変をみた。

その成績からマイコプラズマワクチンのみを投与した場合に比べ、C T B 添加ワクチンは、ワクチンのみを接種した場合より著明に防御効果を示した。

#### 実施例 12

#### 風しんワクチン-L T B 製剤 (点鼻剤) の調製

風しんワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過した L T B とを混合し、1 m l 中にワクチン 3

$\mu\text{g}$ 相当量のウイルス粒子と、LTBを $5\mu\text{g}$ を含むように調整し、適当な安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、ワクチン-LTB点鼻製剤を調製した。本品は $10^\circ\text{C}$ 以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製した風しんワクチンおよびLTBを3週間隔で2回マウスに投与し、血中の抗体産生をみた。

その成績からワクチンのみを投与した場合に産生されるELISA抗体価は $0.133$ であったのに対し、LTB添加ワクチンは、 $0.854$ 以上であり、LTBを添加した場合は、ワクチンのみを接種した場合より著しく抗体産生を増強した。

#### 風しんワクチンにLTBを添加したときの抗体産生の増強

をみた。

その成績から麻しんワクチンのみを投与した場合に産生されるELISA抗体価は、 $0.182$ であったのに対し、LTB添加ワクチンは、 $0.332$ 以上であり、LTBを添加した場合は、ワクチンのみを接種した場合より著しく抗体産生を増強した。

#### 麻しんワクチンにLTBを添加したときの抗体産生の増強

接 種 量		抗体産生 ELISA 価
抗 原	LTB	
麻しんワクチン $20\mu\text{g}$	$5\mu\text{g}$	$0.332$
対 照 $20\mu\text{g}$	$0\mu\text{g}$	$0.182$

接 種 量		抗体産生 ELISA 価
抗 原	LTB	
風しんワクチン $3\mu\text{g}$	$5\mu\text{g}$	$0.854$
対 照 $3\mu\text{g}$	$0\mu\text{g}$	$0.133$

#### 実施例 13

##### 麻しんワクチン-LTB製剤(点鼻剤)の調製

麻しんワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過したLTBとを混合し、 $1\text{mL}$ 中に麻しんワクチン $20\mu\text{g}$ 相当量のウイルス粒子と、LTBを $5\mu\text{g}$ を含むように調整し、適当な安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、麻しんワクチン-LTB点鼻剤を調製した。本品は $10^\circ\text{C}$ 以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製した麻しんワクチンおよびLTBを3週間隔で2回マウスに投与し、血中の抗体産生

#### 実施例 14

##### おたふくかぜワクチン-LTB製剤(点鼻剤)の調製

おたふくかぜワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過したLTBとを混合し、 $1\text{mL}$ 中にワクチン $20\mu\text{g}$ 相当量のウイルス粒子と、LTBを $5\mu\text{g}$ を含むように調整し、適当な安定剤を加え、適当な容器に適量分注し、ワクチン-LTB点鼻製剤を調製した。本品は $10^\circ\text{C}$ 以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製したワクチンおよびLTBを3週間隔で2回マウスに投与し、血中の抗体産生をみた。

その成績からワクチンのみを投与した場合に産生されるELISA抗体価は $0.023$ であったのに対し、LTB添加ワクチンは、 $0.074$ 以上であり、LTBを添加した場合は、ワクチンのみを接種した場合より著しく抗体産生を増強した。

#### おたふくかぜワクチンにLTBを添加したときの抗体産生の増強

接 種 量		抗体産生 E L I S A 価
抗 原	L T B	
おたふくかぜ ワクチン 20 $\mu$ g	5 $\mu$ g	0.074
対 照 20 $\mu$ g	0 $\mu$ g	0.023

#### 実施例 15

##### 麻しん・風しん・おたふくかぜ混合ワクチン- L T B製剤(点鼻剤)の調製

麻しん・風しん・おたふくかぜ混合ワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過したL T Bとを混合し、1 m l中に各々のワクチン7  $\mu$ g、1  $\mu$ g、7  $\mu$ g相当量のウイルス粒子と、L T Bを5  $\mu$ g含むように調製し、適当な安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、ワクチン-L T B点鼻製剤を調製した。本品は10℃以下の冷暗所に保存する。

接 種 量		抗体産生 E L I S A 価
抗 原	L T B	
麻しんワクチン 7 $\mu$ g	5 $\mu$ g	麻しん 0.34
風しんワクチン 1 $\mu$ g		風しん 0.27
おたふくかぜ ワクチン7 $\mu$ g		おたふく 0.28
対 照	0 $\mu$ g	麻しん 0.18
		風しん 0.07
		おたふく 0.13

上記のように調製したワクチンおよびL T Bを3週間隔で2回マウスに投与し、血中の抗体産生をみた。

その成績からワクチンのみを投与した場合に産生されるE L I S A抗体価は、麻しん、風しん、おたふくかぜの各々は、0.18、0.07、0.13であったのに対し、L T B添加ワクチンは、各々0.34、0.27、0.28以上であり、L T Bを添加した場合は、ワクチンのみを接種した場合より著しく抗体産生を増強した。

##### 麻しん・風しん・おたふくかぜ混合ワクチンにL T Bを添加したときの抗体産生の増強

#### 実施例 16

##### ロタワクチン-L T B製剤(経口、点鼻剤)の調製

ロタワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過したL T Bと混合し、1 m l中にワクチン3.3  $\mu$ g相当量のウイルス粒子とL T Bを含むように調製し、適当な安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、ワクチン-L T B経口、点鼻製剤を調製した。本品は、10℃以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製したワクチンおよびL T Bを3週間隔で2回マウスに投与し、血中の抗体産生をみた。

その成績から、ワクチンのみを投与した場合に産生されるE L I S A抗体価は、点鼻接種の場合0.063であったのに対し、L T B添加ワクチンは、0.348以上であり、経口接種の場合は0.024であったのに対し、L T B添加ワクチンは0.177であり、L T Bを添加した場合は、ワクチンのみを接種した場合より著しく抗体産生を増強した。

ロタワクチンにL T Bを混合したときの抗体産生の増強

接 種 量				抗体産生	
抗 原				E L I S A	
ロ タ ワ ク チ ン	点 鼻 接 種	ワクチン	3.3 μg	5 μg	0.348
		対照	3.3 μg	0 μg	0.063
	経 口 接 種	ワクチン	3.3 μg	5 μg	0.177
		対照	3.3 μg	0 μg	0.024

実施例 17

マイコプラズマワクチン-L T B製剤（注射剤）の調製

マイコプラズマワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過したL T Bとを混合し、1 m l中にワクチン $2.0 \times 10^{10}$  CFU（コロニー形成単位）相当量のマイコプラズマと、L T Bを5 μgを含むように調製し、適当な安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、ワクチン-L T B注射製剤を調製した。本品は10℃以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製したワクチンおよびL T Bを2週間隔で3回ニワトリに投与し、マイコプラズマ感染攻撃後病変をみた。

その成績からマイコプラズマワクチンのみを投与した場合に比べ、L T B添加ワクチンは、ワクチンのみを接種した場合より著しく防御効果を示した。

マイコプラズマワクチンにL T Bを添加したときの収容に対する病変の減少

接 種 量			病 変	
抗 原		L T B		
*** 全菌体 $1.0 \times 10^{10}$ CFU		5 μg	3/12	1.23
超音波 処理 $1.0 \times 10^{10}$ CFU		5 μg	2/11	1.27
対照 $1.0 \times 10^{10}$ CFU		0 μg	10/10	2.77

産生応答の経過を示し、

第2図は本発明のワクチン製剤投与による肺内ウイルス感染数の変動を示す。

\*分母は被検動物数、分子は病変を認めたもの

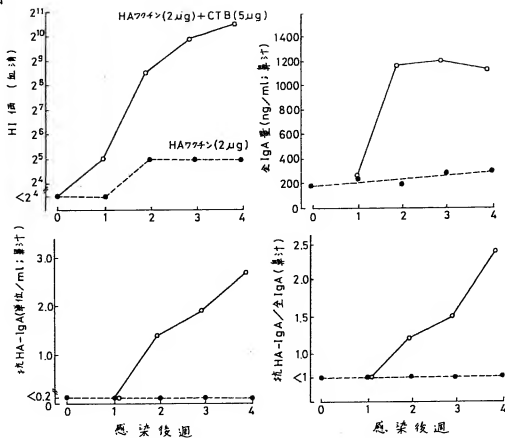
\*\*被検各群の病変の平均値

\*\*\*コロニー形成単位

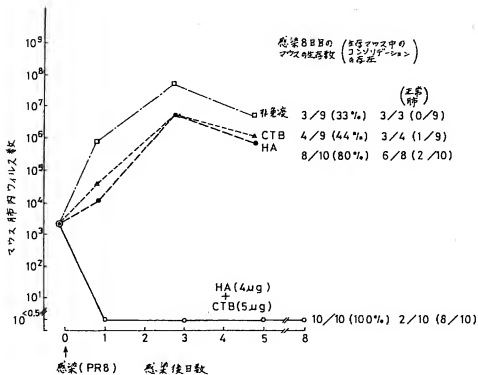
4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明のワクチン製剤投与後の一次抗体

第 1 図



第 2 図



手続補正書

平成 1 年 3 月 3 日

特許庁長官 殿



1. 事件の表示

平成 1 年特許願第 6 7 5 9 号

2. 発明の名称

ワクチン製剤

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 東京都港区白金 5 丁目 9 番 1 号

名称 北里研究所 (社団法人)

代表者 水之江 公英

4. 代理人 〒170

東京都豊島区北大塚 2-25-1

太陽生命大塚ビル 3 階 電話 (917) 1917

(7528) 弁理士 小林 和 憲

(ほか 1 名)



訂正 明 細 書

1. 発明の名称

ワクチン製剤

2. 特許請求の範囲

(1) トキシンまたはそのサブユニットを有効成分とするワクチン製剤。

(2) トキシンが細菌トキシンである特許請求の範囲第 1 項記載のワクチン製剤。

(3) 細菌トキシンがコレラトキシン、ブドウ球菌 α トキシン、ブドウ球菌 δ トキシン、腸炎ビブリオ菌耐熱性溶血トキシン、百日せきトキシンまたは病原性大腸菌易熱性トキシンである特許請求の範囲第 1 項記載のワクチン製剤。

(4) トキシンのサブユニットが B サブユニットである特許請求の範囲第 1 項記載のワクチン製剤。

(5) ワクチンがインフルエンザワクチン、百日せきワクチン、百日せき・ジフテリア・破傷風混合ワクチン、日本脳炎ワクチン、B 型肝炎ワクチン、ロタワクチン、麻しんワクチン、風しんワクチン、おたふくかぜワクチン、麻しん・風しん・おたふ

5. 補正命令の日付

自発

6. 補正の対象

(1) 明細書の特許請求の範囲の欄

(2) 明細書の発明の詳細な説明の欄

7. 補正の内容

別紙の全文訂正明細書の通り訂正します。

くかぜ混合ワクチンまたはマイコプラズマワクチンである特許請求の範囲第 1 項記載のワクチン製剤。

(6) ワクチンとトキシンまたはそのサブユニットとの混合比率が 1 : 0.0001 ~ 1 : 10,000 (重量比) である特許請求の範囲第 1 項記載のワクチン製剤。

(7) 点鼻ワクチンである特許請求の範囲第 1 項記載のワクチン製剤。

(8) 注射剤、スプレー剤または経口投与用形態の剤である特許請求の範囲第 1 項記載のワクチン製剤。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明はワクチン製剤に関する。更に詳しくは本発明はトキシンまたはそのサブユニットを有効成分とするワクチン製剤に関する。

(従来の技術)

ワクチンは、種々の疾病の予防に用いられ、数々の輝かしい成果をあげてきた。しかしながら、

ワクチンの副作用や、また効果が充分でないという例も多くあって、その対策が強く望まれている。副作用を軽減するにはワクチン自体の純度を高めることや、その使用量を少なくすることなどがあるが、それにより効果も小さくなるという避けられない問題がある。

#### 〔発明が解決しようとする課題〕

現在ヒトに使用されているワクチンの多くは、病原体あるいは病原体の一部を取り出し、材料として用いる。従って、病原体を構成する成分や病原体を増殖させる媒体の成分がワクチンに混入することは避けられず、これがワクチン接種の際、副作用を引き起こす原因となる。また、免疫賦与に働く抗原部分そのものも多量に接種されると副作用を誘発する場合もある。

このようなことをできるだけ避け、副作用の起こりにくいワクチンに改善することが必要である。

上記のような課題を解決する方法として、ワクチンの接種量を減少することや、接種ルートを変えることなどがある。本発明者らは、ワクチンの

使用量を減らしても免疫力は減少しないようにするため、ワクチンの免疫力を増強させる方法について種々検討した結果、細菌トキシンとくにコレラトキシン、ブドウ球菌αトキシン、ブドウ球菌δトキシン、腸炎ビブリオ菌耐熱性溶血トキシン、百日せきトキシン、病原大腸菌易熱性トキシン(LT)そのもの、あるいは、それらのサブユニットをワクチンと共に使用することによって、ワクチンの免疫力を増強させることを見出した。また、ワクチンの接種ルートについても検討を行った。

本発明の目的は、ワクチンの使用量を減らすとともに、ワクチンの免疫力を減少させることなく、むしろ免疫力を増強させ得るようにしたワクチン製剤を提供するにある。

#### 〔課題を解決するための手段〕

上記の如き課題を達成するための本発明のワクチン製剤は、トキシンまたはそのサブユニットを有効成分とするワクチン製剤を提供するにある。

トキシンが細菌トキシンであるワクチン製剤で

ある。

細菌トキシンがコレラトキシン、ブドウ球菌αトキシン、ブドウ球菌δトキシン、腸炎ビブリオ菌耐熱性溶血トキシン、百日せきトキシンまたは病原性大腸菌易熱性トキシンであるワクチン製剤である。

トキシンのサブユニットがBサブユニットであるワクチン製剤である。

ワクチンがインフルエンザワクチン、百日せきワクチン、百日せき・ジフテリア・破傷風混合ワクチン、日本脳炎ワクチン、B型肝炎ワクチン、ロタワクチン、麻疹ワクチン、風しんワクチン、おたふくかぜワクチン、麻疹・風しん・おたふくかぜ混合ワクチンまたはマイコプラズマワクチンであるワクチン製剤である。

ワクチンとトキシンまたはそのサブユニットとの混合比率が1:0.0001~1:10.000(重量比)であるワクチン製剤である。

点鼻ワクチンであるワクチン製剤である。

注射剤、スプレー剤または経口投与形態の剤

であるワクチン製剤である。

今、ワクチンとしてインフルエンザワクチン、細菌トキシンとしてコレラトキシン(CT)およびコレラトキシンBサブユニット(CTB)を例にとって説明する。

鼻腔内に接種されたワクチンに対する局所免疫調節剤の一つとして、本発明者らは、ビブリオ・コレラ菌の産生する蛋白質トキシン、コレラトキシンに注目した。このトキシンは、小腸の粘膜に作用し、コレラ下痢症を引き起こす。また、このトキシンは、IgA抗体産生を誘導する強い免疫原であるばかりでなく、トキシンと同時に投与された他の蛋白質抗原に対する免疫応答を増強する免疫調節剤としても知られている。これらCTの効果は、CTが腸管細胞に対して細胞内のcAMPレベルを上げる作用によるらしい。この作用は、CTを構成するA、B2つのサブユニットのうち、CTBが細胞膜のGM<sub>1</sub>ガングリオシドと結合し、コレラトキシンAサブユニットが細胞内に入ってアデニルシクラーゼを活性化することによってい

る。また、作用メカニズムは明らかでないが、CTの免疫増強作用は、それ自身に毒性がないと考えられているCTBと他の蛋白質抗原を腸内に同時に投与した時にも起こることが示されており、有望な局所免疫応答の増強剤であるように思われる。これらの事実は、CTおよびCTBが、腸粘膜においてばかりでなく、呼吸粘膜においても、より毒性が少ない形で、共存する抗原に対する局所免疫応答を増強する可能性を示唆している。

本発明者らは、マウスにおいて鼻腔内接種したHAワクチンに対する局所および血中抗体産生におよぼすCTおよびCTBの増強効果を検討した。また、ワクチン効果の増強剤としてのCTおよびCTBの有用性について検討した。

#### 鼻腔内接種されたHAワクチンに対する免疫応答のCTBによる増強

マウスの鼻腔に接種されたHAワクチン(A/山形)に対する抗体産生と、それに及ぼすCTBの影響を検討した。同時に、鼻腔内接種の結果を、他のルートでの結果と比較した。抗体産生は、H

増強されることを示している。第2表には示されていないが、血清中には抗HA-1 g Aは検出されなかった。

#### HAワクチンとCTBの鼻腔内接種後の一次抗体産生の経過

鼻腔ルートでHAワクチン(A/山形; 2  $\mu$ g)とCTB (5  $\mu$ g)を接種し、マウスにおける抗体産生の経過を検討した。第1図に示されるように、CTBの存在下で血中のワクチンに対するHI抗体産生は、1週目から2週目にかけて急速に増加し、その後も4週目までゆっくりと増加し続けた。鼻汁中の全Ig A量は、接種1週目から2週目にかけて非接種マウスの全Ig A量の6倍位まで急速に増加し、最大レベルに達した。また、その中に含まれている抗HA-1 g Aは、1週目以後4週目までゆっくり増加し続けた。したがって、HAワクチンに対する局所の抗体は、CTBとワクチンを接種後、2週目位から検出されるようになる。

#### CTBのHAワクチンに対する一次および二次

Aワクチン(2  $\mu$ g)を単独あるいはCTB (5  $\mu$ g)と共にマウス鼻腔内に滴下(あるいは腹腔、皮下に注射)後、4週目のマウスの血清および鼻腔洗浄液中の、それぞれHI抗体および抗II Aワクチン-1 g A、抗CTB-1 g Aを測定することによって決定した。第2表の結果から明らかに、HAワクチンを単独で鼻腔内接種したときには、低いレベルのHI抗体しか検出されない。しかし、CTBと共に投与すると血中のHI抗体が、単独の場合よりも6.4倍高く検出された。また、鼻汁中にもHA-1 g A、抗CTB-1 g Aが検出された。一方、腹腔や皮下接種した時、ワクチンのみの接種群でも血中に高いHI抗体が検出され、CTB共存下では更に4~8倍高い産生が見られた。しかし、鼻汁中には抗HA-1 g Aも抗CTB-1 g Aも共に殆ど検出されなかった。以上の結果は、CTBが、共存するHAワクチンに対する抗体産生を増強することを示している。また、鼻腔ルートでHAワクチンをCTBとともに接種した時にのみ局所の抗HA-1 g A産生が

#### 抗体産生増強作用とHAワクチン接種量の影響

CTB (5  $\mu$ g)とHAワクチン(A/山形)をマウスの鼻腔内に接種し抗体産生とワクチンの接種量の関係を検討した。抗体産生は、CTBとワクチン接種後4週目に一次抗体産生を、4週目にワクチン(2  $\mu$ g)のみをさらに二次接種して後2週目に二次抗体産生を検討した。第3表に示されているように、一次応答に関しては、ワクチンのみを接種した場合、接種量が8  $\mu$ gになっても低いレベルの抗体産生しか見られなかった。一方、CTBとワクチンを接種した場合には、接種量が0.03  $\mu$ gでも抗体産生が認められ、その増量に伴って血中のHI抗体、局所のHI-1 g Aは共に増加した。また、二次応答に関しては、ワクチンのみを一次接種したグループでも、一次接種量が増すにつれて、HI抗体、抗HA-1 g Aの増加がみられた。一方、CTBとワクチンを一次接種したグループでは、ワクチンの一次接種量によらず非常に高いHI抗体と抗HA-1 g Aの産生を示した。特に、局所の抗HA-1 g A量

は一次応答の数十倍に達した。これらの結果は、一次接種に用いられたCTBが、共存するワクチンの量に関係なく二次接種による抗体産生を非常に強く誘導する作用があることを示している。即ち、CTBが、共存する比較的低濃度のワクチンに対しても、HAワクチンに対するメモリー効果を強く誘導する作用があることを示している。

#### CTBのHAワクチンに対する免疫応答増強作用と感染抵抗性

CTBによりHAワクチンに対する免疫応答は増強されるが、インフルエンザウイルス感染に対する抵抗が増加されるかどうかを、マウス顕化インフルエンザウイルスPR8株を用いて検討した。PR8株ウイルスHAワクチン(1.5 $\mu$ g)とCTB(5 $\mu$ g)を、マウスの鼻腔内に接種し、4週目にPR8株ウイルスを感染させた。感染3日後のマウス肺内のウイルス量を感染抵抗性の指標として測定した。その結果、第4表に示されるように、ワクチンとCTBを共に接種され、接種後4週目に高い血中のHI抗体と局所の抗HA-

IgA抗体を産生しているマウスでは、肺中にウイルスが検出されず、インフルエンザウイルスに全く侵されていないことを示していた。

ウイルス感染後、3日目の肺内ウイルス量が感染抵抗性の指標になり得ることを確かめるために、HAワクチンをCTBとともにマウスに接種し、4週目にPR8株ウイルスを感染させ、感染後のマウス肺内ウイルス量の変動を検討した。結果は、第2図に示されているように、感染3日後に肺内ウイルスが $<10^{4.5}$ のマウスでは感染1日目ですでに肺内にウイルスが検出されず、その後、少なくとも8日後までその状態が持続し生存し続けた。一方、ワクチンに対する抗体産生が殆どみられなかった対照群では1日目に肺内のウイルス量の増加が見られ、3日目に最大ウイルス量に達した。これら対照群のマウスは感染6日目から死亡、非免疫マウスでは8日目には9匹中6匹の死亡が確かめられた。また生存したマウス3匹も肺内の病変が強く、数日以内に死亡するものと判断された。CTBのみ、あるいはHAワクチンのみを接種し

たマウスのグループでも非免疫マウスの場合と同様の結果であった。従って、ウイルス感染3日後の肺内ウイルス量が感染抵抗性の指標になることが明らかであった。

#### CTBあるいはCTのHAワクチンに対する免疫応答の増強と感染抵抗性

PR8株ウイルスHAワクチン(1.5 $\mu$ g)を様々な濃度のCTあるいはCTBと共に鼻腔内に接種し、4週後の抗体産生と、PR8株ウイルス感染に対する抵抗性を検討した。その結果、第5表に見られるように、CTBが0.05 $\mu$ gでも多少の感染抵抗性を示したが、5 $\mu$ gを添加した時に完全な防御を示した。また、感染抵抗性の増大は、ワクチンとCTB接種4週目の局所のIgAの増加や血中のHI抗体産生の増加と平行しているように思われる。一方、CTは0.05 $\mu$ g以上のどの濃度でも完全な感染防御をし、これらの条件下ではCT濃度の増加に伴って、血中のHI抗体や局所IgA抗体の増加が認められた。このことは、CTはCTBの方が1/10以下の濃

度でも、完全な感染防御に必要な血中のHI抗体や局所のHA-IgAの産生を促進することができるとを示唆している。副作用に関する問題がなければ、CTBよりもCTの方が低濃度で有効なアジュバントとして使える。またこの実験結果から、PR8株ウイルス感染に対する完全な防御のためには、マウス血中にHI抗体が抗体価で32倍以上、鼻汁中に局所抗体が抗HA-IgAにして2単位以上存在することが必要であることを示唆している。各種細菌トキシンのアジュバント作用は第1表に示す通りである。

表 1 表

トキシンの種類	接種量		抗体産生 HI (2°)	生後マウス数
	トキシソ ( $\mu$ g/マウス)	インフルエンザHA ( $\mu$ g/マウス)		
ブドウ球菌トキシン	0.5	1.5	10.0 $\pm$ 1.7	5/5
ブドウ球菌トキシン	5	1.5	<4	5/5
	0.5	1.5	<4	5/5
肺炎ヒブリオ菌前 熱性溶血トキシン	5	1.5	11.5	5/5
	0.5	1.5	9.8 $\pm$ 1.1	5/5
肺炎大腸菌熱性 トキシン (LT)	5	1.5	11.8 $\pm$ 0.4	5/5
	0.5	1.5	10.8 $\pm$ 2.2	5/5
百日せきトキシン	5	1.5	11.6 $\pm$ 0.5	5/5
	0.5	1.5	10.2 $\pm$ 1.7	5/5
対 照	0	1.5	<4	0/5
			<4	0/5

表 2 表 コレラトキシソBサブユニット (CTB) によるインフルエンザHAワクチン (A/山形) に対する抗体応答の増強と接種ルートによる増強効果の比較

グループ No.	接種条件			接種4週間後の抗体応答		
	接種材料		接種ルート	局 所 (鼻汁)		
	HAワクチン (2 $\mu$ g)	CTB (5 $\mu$ g)		血中 HI抗体価 (2°)	抗HA-IgA (単位)	抗CTB-IgA (単位)
1	-	-	-	<2°	<0.2	<0.2
2	-	+	鼻腔	<2°	<0.2	8.3 $\pm$ 0.3
3	+	-	鼻腔	2°	<0.2	<0.2
4	+	+	鼻腔	2 <sup>11</sup>	3.3 $\pm$ 0.3	7.4 $\pm$ 1.1
5	+	-	腹腔	2°	<0.2	<0.2
6	+	+	腹腔	2 <sup>11</sup>	<0.2	0.2
7	+	-	皮下	2°	<0.2	<0.2
8	+	+	皮下	2 <sup>11</sup> $\pm$ 0.7	<0.2	0.2

第 3 表 CTBによるHAワクチンに対する一次および二次抗体応答の増強とHAワクチン接種量の影響

グループ No.	一次 接種接種材料		一次接種 4 週間後 の抗体応答		二次接種 (2 $\mu$ g HAワクチン 2 週間後の抗体応答	
	HA	CTB	血中	局所 (鼻汁)	血中	局所 (鼻汁)
	( $\mu$ g)	(5 $\mu$ g)	HI 抗体 (単位)	抗HA-IgA (単位)	HI 抗体 (単位)	抗HA-IgA (単位)
1	-	-	<2 <sup>a</sup>	<0.2	2 <sup>a</sup>	<0.2
2	-	+	<2 <sup>a</sup>	<0.2	2 <sup>a, b</sup> $\pm$ 0.7	1.2 $\pm$ 1.2
3	0.03	-	<2 <sup>a</sup>	<0.2	2 <sup>a</sup>	2.9 $\pm$ 1.6
4	0.5	-	<2 <sup>a</sup>	<0.2	2 <sup>a, b</sup> $\pm$ 0.7	2.6 $\pm$ 0.6
5	8	-	2 <sup>a</sup>	0.3 $\pm$ 0.1	2 <sup>a, b</sup> $\pm$ 0.7	4.5 $\pm$ 2.1
6	0.03	+	2 <sup>a</sup>	0.7 $\pm$ 0.3	2 <sup>a, b</sup> $\pm$ 0.7	6.0 $\pm$ 4
7	0.5	+	2 <sup>a, b</sup> $\pm$ 0.7	2.5 $\pm$ 0.4	2 <sup>a, b</sup> $\pm$ 0.7	11.3 $\pm$ 2.7
8	8	+	2 <sup>a, b</sup> $\pm$ 0.7	4.6 $\pm$ 0.3	2 <sup>a, b</sup> $\pm$ 0.7	7.8 $\pm$ 1.0

第 4 表 CTBによるHAワクチン (PR8株) に対する抗体応答の増強と感染抵抗性

グループ No.	接種接種材料		接種 4 週間後の抗体応答		感染 3 日後の マウス肺内ウ イルス量 EID <sub>50</sub> (10 <sup>-6</sup> )	罹患率 (%)
	HAワクチン	CTB	血中	局所 (鼻汁)		
	(1.5 $\mu$ g)	(5 $\mu$ g)	HI 抗体 (2 <sup>a</sup> )	抗HA-IgA (単位)		
1	-	-	<2 <sup>a</sup>	<0.2	10 <sup>4.8</sup> $\pm$ 0.3	5/5 (100)
2	-	+	<2 <sup>a</sup>	<0.2	10 <sup>7.1</sup> $\pm$ 0.3	5/5 (100)
3	+	-	<2 <sup>a</sup>	<0.2	10 <sup>6.7</sup> $\pm$ 0.3	5/5 (100)
4	+	+	2 <sup>a, b</sup> $\pm$ 1.2	4.6 $\pm$ 0.7	10 <sup>6.5</sup>	0/5 (0)

表 5 表 CTBあるいはCTによるHAワクチン (PR8株) に対する抗体応答の増強と感染抵抗性

グループ No.	鼻腔接種材料		血中 HI抗体価 (2°)	接種4週間後の抗体応答 鼻所 (鼻汁)		感染3日後のマ ウス肺内ウイルス 量 (E.D. <sub>50</sub> ) (10 <sup>4</sup> )
	HAワクチン (1.5 µg)	CTB (CT) (µg)		抗HA-IgA (単位)	抗CTB-IgA (単位)	
1	-	-	<2 <sup>+</sup>	<0.2	<0.2	10 <sup>4.5</sup>
2	-	CTB (5)	<2 <sup>+</sup>	<0.2	6.2 ± 1.3	10 <sup>4.1</sup>
3	+	-	<2 <sup>+</sup>	<0.2	<0.2	10 <sup>4.7</sup>
4	+	CTB (0.05)	<2 <sup>+</sup>	0.5	<0.2	10 <sup>4.9</sup>
5	+	CTB (0.5)	2 <sup>+</sup> ± 0.7	1.2 ± 0.9	1.5 ± 1.0	10 <sup>4.5</sup>
6	+	CTB (5)	2 <sup>+</sup> ± 0.7	4.6 ± 0.7	3.7 ± 0.6	10 <sup>4.8</sup>
7	+	CT (0.05)	2 <sup>+</sup>	2.0 ± 0.8	<0.2	10 <sup>4.8</sup>
8	+	CT (0.5)	2 <sup>+</sup>	3.2 ± 0.6	0.6 ± 0.6	10 <sup>4.8</sup>
9	+	CT (5)	2 <sup>+</sup> ± 0.7	3.1 ± 0.1	2.7 ± 0.1	10 <sup>4.8</sup>

以上のことより次のことが明らかになった。

(1) CTおよびCTBは共存するインフルエンザ  
HAワクチンに対する抗体産生を増強する。

(2) ワクチンをCTBとともに鼻腔ルートで接種  
すると、血中のHI抗体産生と共に局所 (鼻汁)  
の抗HA-IgA産生も増強される。一方、腹腔  
や皮下ルートで接種した場合には、局所のHA-  
IgA産生は殆ど見られない。しかし、血中には  
高いHI抗体産生が出現する。すなわち、CTB  
は接種ルートに関係なく抗体産生増強作用がある。  
この事実には後に述べるCT、CTB、ブドウ球菌  
α毒素、ブドウ球菌δトキシン、腸炎ヒブリオ菌  
耐熱性溶血トキシン、百日せきトキシンまたは病  
原大腸菌腸熱性トキシン毒素と百日せきワクチン、  
百日せき・ジフテリア・破傷風混合ワクチン、B  
型肝炎ワクチン、日本脳炎ワクチン、麻しんワク  
チン、風しんワクチン、おたふくかぜワクチン、  
麻しん・風しん・おたふくかぜ混合ワクチン、ロ  
タワクチン、マイコプラズマワクチンと混合投与  
するとき、これらワクチン単独投与より更に高い

抗体価を得ることができることにつながる。換言  
すればトキシンおよびそれらのサブユニットを使  
用することによって、ワクチン量を減少させるこ  
がで、副作用を軽減することができる。

(3) ワクチンとCTBを鼻腔ルートで接種すると、  
局所の抗HA-IgAは2週目から4週目までそ  
の産生量が増加し続ける。

(4) ワクチンとCTBを鼻腔ルートで二次接種し  
た時の4週目の抗体産生は、接種に用いたワクチ  
ンの量に比例して増加する。

(5) ワクチンとCTBをマウス鼻腔ルートで一次  
接種した後、4週目にワクチンのみを同一ルート  
で二次接種すると、その2週後の二次抗体産生は、  
一次接種に用いたワクチンの量に拘らず非常に高  
くなる。即ち、CTBは共存する一次接種に用い  
たワクチンが低濃度の場合でも、ワクチンに二次  
刺激に対する非常に高い抗体産生を誘導する作用  
があった。したがって、CTBは、強いメモリー  
効果を誘導する作用がある。

(6) ワクチンとCTBを鼻腔ルートで接種多量の

血清抗体や局所H—1 g Aを産生している接種後4週目のマウスでは、インフルエンザに対する感染が成立しない。本発明者らが用いた条件では、血中のH I価が32倍以上、局所抗体が2単位以上を有するマウスでは、PR8ウイルス感染に対する防御が成立した。

(7) ワクチンと共に鼻腔ルートで接種されたとき、完全なウイルス感染防御に要する抗体産生誘導のために必要なCTBの量は、 $\mu$ gのオーダーであった。一方、CTの場合、CTBの1/10以下の濃度でも完全な感染防御に必要な抗体産生を誘導した。

本発明において使用されるトキシンあるいはそのサブユニット、例えばCTまたはCTBは、公知のCTおよびCTB調製法に従って調製することができるが、いずれも市販されているので、それを用いることができる。CTは大量に動物に投与すると毒性を現すが、少量であれば鼻腔内（あるいは腹腔内）では問題がない。CTBはCTに比べて毒性が遙かに少なく鼻腔内投与では全

く問題ない。更に、ブドウ球菌 $\alpha$ トキシン、ブドウ球菌 $\delta$ トキシン、腸炎ビブリオ菌耐熱性溶血トキシン、百日せきトキシン、病原大腸菌易熱性トキシンが挙げられる。

ワクチンとしては、インフルエンザワクチン、百日せきワクチン、百日せき・ジフテリア・破傷風混合ワクチン、B型肝炎ワクチン、日本脳炎ワクチン、麻しんワクチン、風しんワクチン、おたふくかぜワクチン、麻しん・風しん・おたふくかぜ混合ワクチン、ロタワクチン、マイコプラズマワクチン等の各種ワクチンが挙げられる。これらのワクチンは、通常のこれらワクチン製造法に従って製造可能である。各種ワクチンの製造法、性質を模倣すると以下の通りである。

インフルエンザワクチン；発育鶏卵で増殖させたウイルスをエーテル、界面活性剤などで分解精製して得たあるいは遺伝子操作や化学合成によって得た血球凝集素（HA）、ノイラミニダーズ（NA）、核蛋白質（NP）、マトリックス蛋白質（M）あるいはその一部を含むワクチン。

百日せきワクチン；百日せき菌を培養した培養液あるいは菌体より塩析、超遠心などを用いて抽出し、ホルマリンで無毒化したもの、または、遺伝子操作や化学合成によって得た百日せき菌毒素（PT）、血球凝集素（FHA）、K-凝集素、あるいは、その一部などを含むワクチン。

百日せき・ジフテリア・破傷風混合ワクチン；百日せきワクチンにジフテリアトキソイドおよび破傷風トキソイドを混合したワクチン。

日本脳炎ワクチン；マウス 内で増殖したウイルスを超遠心あるいはエチルアルコールなどを用いてウイルス粒子を精製した後、ホルマリンで不活化したもの、あるいは遺伝子操作や化学合成などによって得た抗原蛋白質あるいはその一部を含むワクチン。

B型肝炎ワクチン；B型肝炎キャリアの血液を原材料とし、塩析、超遠心を用いてHBs抗原を分離精製したもの、あるいは遺伝子操作や化学合成などによって得た抗原蛋白質あるいはその一部を含むワクチン。

麻しんワクチン；ニワトリ胎児細胞などの培養細胞、あるいは、発育鶏卵で増殖させたウイルス、あるいは、その一部、または、遺伝子操作や化学合成によって得た感染防御抗原を含むワクチン。  
風しんワクチン；ニワトリ胎児細胞などの培養細胞、あるいは、発育鶏卵で増殖させたウイルス、あるいは、その一部、または、遺伝子操作や化学合成によって得た感染防御抗原を含むワクチン。  
おたふくかぜワクチン；家兎細胞などの培養細胞あるいは発育鶏卵で増殖させたウイルス、または、その一部、あるいは、遺伝子操作や化学合成によって得た感染防御抗原を含むワクチン。

麻しん・風しん・おたふくかぜ混合ワクチン；麻しん・風しん・おたふくかぜワクチンを混合したワクチン。

ロタワクチン；MA104細胞など培養細胞で増殖させたウイルスまたは患者の糞便中より得たウイルスあるいは遺伝子操作または化学合成など、または、その一部により得た感染防御抗原を含むワクチン。

マイコプラズマワクチン：マイコプラズマ液体培養で増強したマイコプラズマ、または、その一部、あるいは、遺伝子操作や化学合成などにより得られた感染防御抗原を含むワクチン。

上記ワクチンは液状または粉末状で供される。

勿論、これらワクチンはトキシンまたはそのサブユニットと共に投与されるときは液状の方が鼻腔内投与（鼻腔内スプレー、滴下、塗布など）や注射の場合に適していることはいうまでもない。さらに、鼻腔内投与の場合は、粉末スプレー方式も可能である。投与量は、マウスの場合、鼻腔内で  $5 \mu\text{L} \sim 50 \mu\text{L}$ 、ヒトの場合は鼻腔内投与、注射いずれも  $0.1 \sim 0.5 \text{ mL}$  が適当である。これらの量は勿論適宜変更し得ることはいうまでもない。

ワクチンとトキシンまたはそのサブユニットの混合比率は、 $1:0.0001 \sim 1:10,000$ （重量比）であり、ワクチンの種類に応じたヒトの投与量に従えばよい。

本発明のワクチン製剤は、上記ワクチンにトキ

シンまたはそのサブユニットを所定の量比で混合することにより調製される。調製は厳密に無菌的に行わなければならないことはいうまでもなく、それぞれの原材料も完全に無菌的でなければならない。勿論、ワクチン作用以外に必要なないバイロジェンやアレルギー源となるような夾雑タンパクは可能な限り除去されなければならない。

本発明のワクチン製剤は、ワクチン自体とトキシンまたはそのサブユニットをそれぞれ別々に調製、製剤化しておき、用時に混合するか、または別々に同時に投与するという方法によっても、効果を発揮させることができる。

以下参考例としてインフルエンザワクチンとCTまたはCTBを混合した本発明のワクチン製剤の効果を示した実験例を挙げる。

#### 参考例

##### 動物：

Balb/c、6～8週令の雌マウスを用いた。

##### HAワクチン：

精製ウイルスよりエーテル処理によって脂質成

分を除去したものをHAワクチンとして用いた。このHAワクチン中にはHA成分が約30%含まれており、第2表～第5表に示す結果中のワクチンの接種量は、その中のHA量に換算して表記した。

#### CTおよびCTB

コレラトキシン（CT）とそのコレラトキシンBサブユニット（CTB）は共に市販品（米国、シグマ社製）を購入して用いた。この実験で用いられたCTBには、SDSポリアクリルアミドゲルの電気泳動上でコレラトキシンAサブユニットの混入は認められなかった。

#### 接種ルートおよび接種法：

接種材料はHAワクチンあるいはアジュバントをリン酸緩衝生理食塩水（PBS）で適当濃度に希釈し調製した。鼻腔ルートでの接種は、マウスをアモバルビタルナトリウムで麻酔後、左側鼻腔にマイクロピペットで  $20 \mu\text{L}$  の接種材料を滴下することによって行った。皮下ルートからの接種は麻酔条件下でマウス背部皮下に  $100 \mu\text{L}$  の

接種材料を注射することによって行った。また、腹腔からの接種は、 $100 \mu\text{L}$  の接種材料を注射することによって行った。

#### 血液及び鼻汁の回収：

血液はエーテル麻酔条件下で、マウスの心臓より全採血によって、回収した。鼻汁は、放血後のマウスの左右の鼻孔より  $1 \text{ mL}$  のPBSを2回づつ遠流することによって回収した。

#### 赤血球凝集抑制（HI）抗体価の測定：

HI価測定のための血清は先ずRDE（Receptor Destroying Enzyme）によって血清中の非特異的赤血球凝集抑制物質を除去した。次に、血清はU型マイクロタイタープレート上で2倍シリーズの希釈をし、16HAユニットのウイルスとともに混合し、30分間室温放置後、鶏赤血球を加えることによって、分析した。結果は、室温で1時間放置後、決定した。

#### 抗HA-IgA、抗CTB-IgA、全IgA量の測定：

血清および鼻汁中の抗HA-IgA抗CTB-I

g A、全 Ig A 量は酵素免疫測定法 (E L I S A) によって測定した。抗 H A - I g A や抗 C T B - I g A の定量の際には、コーティング緩衝液に懸濁した H A ワクチン ( $5 \mu\text{g}/\text{m}\ell$ ) や C T B ( $5 \mu\text{g}/\text{m}\ell$ )  $50 \mu\ell$  で、先ず 96 穴の E I A プレート (half-area, Costar, Cambridge, MA) 各孔 (well) をコートした。室温に 2 時間放置後、PBS-tween でプレート洗浄した、次に、1 % 牛血清アルブミン (BSA) (及び 0.1 % NaCl) を含む PBS、 $100 \mu\ell$  で各孔をコートした。4℃に一昼夜放置後、PBS-tween で洗浄し、各孔に血清あるいは鼻汁試料を  $50 \mu\ell$  づつ入れた。室温に 2 時間放置後、PBS-tween で洗浄し、次に各孔に  $50 \mu\ell$  づつ、PBS-tween で希釈したアルカリホスファターゼ結合の山羊抗マウス Ig A ( $\alpha$  の鎖特異性、1:1000、米国、ザメット ラボ社製) を加えた。室温に 1 時間放置後、PBS-tween で洗浄後、各孔に  $100 \mu\ell$ 、pH 9.8 で 1

0 % ジエタノールアミンを含む緩衝液に懸濁した p-ニトロフェニルフェート ( $1 \text{mg}/\text{m}\ell$ ; シグマ社製) を加えた。室温で 20 ~ 30 分間放置後、発色を S J e i a オートリッド (モデル、E R - 8000、三光純薬社製) を使って OD<sub>492</sub> で測定した。検量線は、プレート毎に作り、各試料の値は、S J e i a オートリッドに内蔵されている二次の logit-log 方式によって帰属した検量線に基づいて決めた。抗 H A - I g A 定量の標準液としては、H A ワクチンを鼻腔内より 2 週間毎に 5 回接種したマウスの鼻汁を 8 単位と決めて用いた。また、抗 C T B - I g A 定量の標準液としては、C T B ( $5 \mu\text{g}$ ) を鼻腔内より接種し 4 週目のマウスの鼻汁 (Ig A 量の多かったもの) を 8 単位と決めて使用した。全 Ig A 量の定量には、先ず  $1 \mu\text{g}/\text{m}\ell$  の山羊抗マウス Ig A を各孔に  $50 \mu\ell$  づつ加える操作を除いて同様の操作を行った。全 Ig A 定量の標準液としては、マウスの精製 Ig A ミエローマ (米国、マイルス ラボラトリー社製) を用いた。

#### PR8 株ウイルスによるマウスの感染：

マウスをアモバルビタルナトリウムで麻酔し、ウイルスの 0.01 % BSA を含む懸濁液をマウス左側鼻腔内に  $20 \mu\ell$  滴下することにより、感染させた。PR8 株ウイルスは、フェレットで 148 代、マウスで 596 代、孵化鶏卵で 72 継代した感染価  $10^{5.5}$  の懸液原液を、5,000 ~ 10,000 倍希釈して用いた。この感染条件では非免疫マウスの 90 % 以上が 14 日目以内に死亡するか、あるいは肺内にコンソリデーションを形成した。

#### 肺のウイルス量の測定：

感染後 3 日目のウイルスから肺を摘出し、乳鉢磨砕し、PBS で 10 % 乳剤とした。それを 2500 回転で遠心した上清を、10 倍段階希釈後、それぞれの希釈液を孵化鶏卵 (5 個) に接種した。卵内でのウイルスの増殖は、懸液の赤血球凝集によって決定し、感染を示した卵に、接種した肺乳剤の最低希釈の価を E I D<sub>50</sub> により決定し、マウスの肺ウイルス価とした。肺ウイルス価は平均

値 ( $\pm$  SD) 表現した。実験によっては、1 群 5 匹のマウス肺をブールして肺乳剤を作り、その肺ウイルス価を決定した。

#### 罹患率：

1 群 5 匹のマウスの 10 % 肺乳剤中に、 $> 10^4$  のウイルスが検出されたマウスの数によって罹患率を示した。

#### 統計処理：

生体内感染実験における感染防御能の有意差は、Student's test によって検定された。

以下、本発明の実施例について詳細に説明するが、本発明は何らこれのみに限定されるものではない。

#### (実施例)

##### 実施例 1

#### インフルエンザ H A ワクチン - C T B 製剤 (点鼻剤の調製)：

インフルエンザ H A ワクチン ( $1 \text{mg H A}/\text{m}\ell$ ) とリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過した C

T Bと混合し、20  $\mu$  l中のインフルエンザH Aワクチン1.5~2  $\mu$  gと、C T B 3.5~250  $\mu$  gを含むように調製し、適当な防腐剤および安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、インフルエンザH Aワクチン-C T B点鼻剤とした。本品は10℃以下の冷暗所に保存する。実験成績は、前述の通り。

#### 実施例 2

##### インフルエンザH Aワクチン-C T B製剤(注射剤)の調製:

インフルエンザH Aワクチン(1 mg H A/m l)とリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過したC T Bと混合し、0.5 ml中にインフルエンザH Aワクチン1.5~2  $\mu$  gと、C T B 2.5~250  $\mu$  gを含むように調製し、適当な防腐剤および安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、インフルエンザH Aワクチン-C T B注射剤を調製した。本品は10℃以下の冷暗所に保存する。実験成績は、前述の通り。

##### B型肝炎ワクチンおよびC Tを添加したときの抗体産生の増強

検 体	抗 体 価 P H A
C T	2 <sup>3.4</sup>
無添加	2 <sup>3.4</sup>

抗体価は受身赤血球凝集反応により測定した。

抗体価はマウス5頭の平均値。

#### 実施例 4

##### 百日せきワクチン-C T B製剤(点鼻剤)の調製:

百日せきワクチンとリン酸緩衝液食塩水に溶解し無菌濾過したC T Bとを混合し、20  $\mu$  l中に百日せきワクチン14  $\mu$  g蛋白質質素と、C T Bを2.5~250  $\mu$  gを含むように調製し、適当な防腐剤および安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、百日せきワクチン-C T B経鼻投与剤を調製した。

#### 実施例 3

##### B型肝炎ワクチン-C T B製剤(注射剤)の調製:

B型肝炎ワクチンとリン酸緩衝液食塩水に溶解し無菌濾過したC T Bとを混合し、20  $\mu$  l中にH B s抗原40  $\mu$  g 蛋白質と、C T Bを2.5~250  $\mu$  gを含むように調製し、適当な防腐剤および安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、B型肝炎ワクチン-C T B注射剤を調製した。本品は10℃以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製したB型肝炎ワクチンおよびC Tをマウスに接種し、3週間後の血中抗体産生を調べた。

この成績から、B型肝炎ワクチンのみを接種されたマウスでは、2<sup>3.4</sup>単位(受身赤血球凝集反応)であったのに対し、C Tを添加したものは10<sup>4.4</sup>単位であり、抗体産生が増強された。

本品は10℃以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製した百日せきワクチン13  $\mu$  g蛋白質質素20  $\mu$  lに、C T BおよびC Tを添加し、マウスの鼻腔内に接種し、さらに4週後に同量のワクチンを追加接種し、抗体産生を調べた。

この成績から、百日せきワクチンのみを接種されたマウスでは、抗P T抗体は、4.1国際単位以下であったのに対し、C T Bを添加したものでは、140.3単位、C Tを添加したものでは232.5単位と上昇した。抗P H A抗体では、ワクチンのみC T B添加、C T添加でそれぞれ2.6単位以下、32.0単位以下、43.9単位であり、C T BあるいはC Tを添加したものは、ワクチンのみを接種した場合に比べ、著しく抗体産生が増強された。

百日せきワクチンにCTおよびCTBを添加したときの抗体産生の増強

検 体	抗 体 価	
	抗 P T	抗 F H A
C T	2 3 2 . 5	4 3 . 9
C T B	1 4 0 . 3	3 2 . 0
無添加	< 4 . 1	< 2 . 6

抗体価はマウス5頭の平均値

抗体価はE L I S A 国際単位

実施例 5

百日せき・ジフテリア・破傷風混合ワクチン

CTB製剤(点鼻剤)の調製:

百日せき・ジフテリア・破傷風混合ワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過したCTBとを混合し

、200μg中に混合ワクチン50μg蛋白質要素とCTBを2.5~250μgを含むように調製し、適当な防腐剤および安定剤を加え、適当な容器に過量分注して、百日せき・CTB経鼻投与剤を調製した。本品は10℃以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製した百日せき・ジフテリア・破傷風混合ワクチンにCTBを添加し、マウスの鼻腔内に接種し、さらに4週後に同量のワクチンを追加接種し、抗体産生を調べた。

この成績から、百日せき・ジフテリア・破傷風混合ワクチンのみを接種されたものでは、抗百日せきトキシン(P T)抗体は、2.0国際単位以下、抗ジフテリアトキソイド(D T)抗体は1.5単位以下、抗破傷風トキソイド(T T)は1.5単位であったのに対し、LTBを添加したものではそれぞれ150.0、110.5、120.0単位と、CTBを添加したものはワクチンのみのものに比べ、抗体産生が増強された。

百日せき・ジフテリア・破傷風混合ワクチンにCTBを添加したときの抗体産生の増強

抗原:接種量	C T B	抗体産生 E L I S A 価
百日せきワクチン 14μg ジフテリアトキソイド 16μg 破傷風トキソイド 15μg	5μg	150.0 110.5 120.0
百日せきワクチン 14μg ジフテリアトキソイド 16μg 破傷風トキソイド 15μg	0μg	<2.0 <1.5 <1.5

抗体価はマウス5頭の平均値

抗体価はE L I S A 国際単位

実施例 6

日本脳炎ワクチン-CTB製剤(注射剤)の調製:

日本脳炎ワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過したCTBとを混合し、1ml中に日本脳炎10<sup>7.5</sup>PFU相当量の不活化ウイルス粒子と、CTBを10.0~0μgを含むように調製し、適当な防腐剤および安定剤を加え、適当な容器に過量分注して、日本脳炎ワクチン-CTB注射剤を調製した。本品は10℃以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製した日本脳炎ワクチンおよびCTBあるいはCTを、1週間隔で2回マウスに接種し、血中の抗体量をみた。

その成績から、日本脳炎ワクチンのみを接種した場合に産生される中和抗体価は10<sup>1.5</sup>であったのに対し、CTB添加、CT添加は、それぞれ10<sup>2.5</sup>以上、10<sup>3.5</sup>以上であり、CTB、CTを添加した場合は、ワクチンのみを接種した場合より著しく抗体産生を増強した。

日本脳炎ワクチンにCTおよびCTB添加した  
ときの抗体産生の増強

検 体	添 加 濃 度	中和抗体価 10 <sup>*</sup>
C T	0. 0 5 $\mu$ g / MOUSE	3. 3 9
	0. 5 $\mu$ g	3. 2 0
	5. 0 $\mu$ g	3. 5 2
C T B	0. 0 5 $\mu$ g / MOUSE	2. 5 8
	0. 5 $\mu$ g	2. 7 0
	5. 0 $\mu$ g	3. 3 9
無添加		1. 8 8

麻しんワクチンにCTBを添加したときの抗体  
産生の増強

接 種 量		抗体産生 E L I S A 価
抗 原	C T B	
麻しんワクチン 20 $\mu$ g	5 $\mu$ g	0. 2 1
対 照 20 $\mu$ g	5 $\mu$ g	0. 1 4 4

実施例 8

風しんワクチン-CTB製剤(点鼻剤)の調製:

風しんワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌  
濾過したCTBとを混合し、20  $\mu$ g中にワクチン  
20  $\mu$ g相当量のウイルス粒子と、CTBを5  $\mu$ g  
を含むように調製し、適当な安定剤を加え、適当な  
容器に過量分注して、ワクチン-CTB点鼻製剤を  
調製した。本品は10℃以下の冷暗所に保存する。

抗体価はマウス10頭のプール血清の抗体価

実施例 7

麻しんワクチン-CTB製剤(点鼻剤)の調製:

麻しんワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌  
濾過したCTBとを混合し、20  $\mu$ g中に麻しんワ  
クチン20  $\mu$ g相当量のウイルス粒子と、CTBを  
5  $\mu$ gを含むように調製し、適当な安定剤を加え、  
適当な容器に過量分注して、麻しんワクチン-CT  
B点鼻製剤を調製した。本品は10℃以下の冷暗所  
に保存する。

上記のように調製した麻しんワクチンおよびCT  
Bを3週間隔で2回マウスに投与し、血中の抗体産  
生をみた。

その成績から麻しんワクチンのみを投与した場  
合に産生されるELISA抗体価は0. 144であ  
ったのに対し、CTB添加ワクチンは、0. 209  
以上であり、CTBを添加した場合は、ワクチンのみ  
を接種した場合より著しく抗体産生を増強した。

上記のように調製した風しんワクチンおよびCT  
Bを3週間隔で2回マウスに投与し、血中の抗体産生  
をみた。

その成績からワクチンのみ投与した場合に産生さ  
れるELISA抗体価は0. 095であったのに対  
し、CTB添加ワクチンは、0. 920以上であり  
、CTBを添加した場合は、ワクチンのみを接種し  
た場合より著しく抗体産生を増強した。

風しんワクチンにCTBを添加したときの抗体  
産生の増強

接 種 量		抗体産生 E L I S A 価
抗 原	C T B	
風しんワクチン 20 $\mu$ g	5 $\mu$ g	0. 9 2 0
対 照 20 $\mu$ g	0 $\mu$ g	0. 0 9 5

おたふくかぜワクチン-CTB製剤(点鼻剤)の調製:

おたふくかぜワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過したCTBとを混合し、20 $\mu$ g中にワクチン20 $\mu$ g相当量のウイルス粒子と、CTBを5 $\mu$ gを含むように調製し、適当な安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、ワクチン-CTB点鼻製剤を調製した。本品は10℃以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製したワクチンおよびCTBを3週間隔で2回マウスに投与し、血中の抗体産生をみた。

その成績からワクチンのみを投与した場合に産生されるELISA抗体価は0.028であったのに対し、CTB添加ワクチンは、0.045以上であり、CTBを添加した場合は、ワクチンのみを接種した場合より著しく抗体産生を増強した。

接 種 量		抗体産生 ELISA価
抗 原	CTB	
おたふくかぜワクチン 20 $\mu$ g	5 $\mu$ g	0.05
対 照 20 $\mu$ g	0 $\mu$ g	0.028

実施例 10

麻疹・風しん・おたふくかぜ混合ワクチン-CTB製剤(点鼻剤)の調製:

麻疹・風しん・おたふくかぜ混合ワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過したCTBとを混合し、20 $\mu$ g中に各々のワクチン7 $\mu$ g、1 $\mu$ g、7 $\mu$ g相当量のウイルス粒子と、CTBを5 $\mu$ gを含むように調製し、適当な安定剤を加え、適当な

容器に適量分注して、麻疹・風しん・おたふくかぜ混合ワクチン-CTB点鼻剤を調製した。本品は10℃以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製したワクチンおよびCTBを3週間隔で2回マウスに投与し、血中の抗体産生をみた。

その成績からワクチンのみを投与した場合に産生されるELISA抗体価は麻疹・風しん・おたふくかぜの各々は、0.14、0.09、0.15であったのに対し、CTB添加ワクチンは、各々0.29、0.30、0.24以上であり、CTBを添加した場合は、ワクチンのみを接種した場合より著しく抗体産生を増強した。

麻疹・風しん・おたふくかぜ混合ワクチンにCTBを添加したときの抗体産生の増強

接 種 量		抗体産生 ELISA価
抗 原	CTB	
麻疹ワクチン 7 $\mu$ g	5 $\mu$ g	麻疹 0.29
風しんワクチン 7 $\mu$ g		風しん 0.30
おたふくかぜワクチン 7 $\mu$ g		おたふく 0.24
対 照		麻疹 0.14 風しん 0.09 おたふく 0.15

## 実施例 11

ロタワクチン-CTB製剤（経口、点鼻剤）の調製：

ロタワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過したCTBとを混合し、20μg中にワクチン3・3μg相当量のウイルス粒子とCTBを5μgを含むように調製し、適当な安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、ロタワクチン-CTB経口、点鼻製剤を調製した。本品は10℃以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製したロタワクチンおよびCTBを3週間隔で2回マウスに投与し、血中の抗体産生をみた。

その成績から、ワクチンのみを投与した場合に産生されるELISA抗体価は、点鼻接種の場合、0・089であったのに対し、CTB添加ワクチンは0・281であり、また、経口接種の場合、0・018であったのに対し、CTB添加ワクチンは0・227であり、いずれもCTBを添加した場合は、ワクチンのみを接種した場合より著しく抗体産生を

増強した。

ロタワクチンにCTBを混合したときの抗体産生の増強

接 種 量					抗体産生 ELISA 価
抗 原				CTB	
ロ タ ワ ク チ ン	点 鼻 接 種	ワクチン	3.3 μg	5μg	0.281
		対 照	3.3 μg	0μg	0.089
	経 口 接 種	ワクチン	3.3 μg	5μg	0.227
		対 照	3.3 μg	0μg	0.018

## 実施例 12

マイコプラズマワクチン-CTB製剤（注射剤）の調製：

マイコプラズマワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過したCTBとを混合し、1ml中にワクチン2・0×10<sup>11</sup>CFU（コロニー形成単位）相当量のマイコプラズマと、CTBを10μgを含むように調製し、適当な安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、ワクチン-CTB注射剤を調製した。本品は10℃以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製したワクチンおよびCTBを2週間隔で3回ニワトリに投与し、マイコプラズマ感染攻撃後病変をみた。

その成績からマイコプラズマワクチンのみを投与した場合に比べ、CTB添加ワクチンは、ワクチンのみを接種した場合より著明に防御効果を示した。

マイコプラズマワクチンにCTBを添加したときの攻撃に対する病変の減少

接 種 量			病 変
抗 原		CTB	
全 菌 体 ***			* **
1・0×10 <sup>11</sup> CFU		5μg	3/10 125
超音波処理			
1・0×10 <sup>11</sup> CFU		5μg	3/11 129
対 照			
1・0×10 <sup>11</sup> CFU		0μg	10/10 277

\* : 分母は被検動物数、分子は病変を認めたもの

\*\* : 検各群の病変の平均値

\*\*\* : コロニー形成単位

百日せきワクチン-LTB製剤(点鼻剤)の

調製:

百日せきワクチンとリン酸緩衝液食塩水に溶解し無菌濾過したCTBとを混合し、20μl中に百日せきワクチン14μgと蛋白質窒素と、LTBを2.5~250μgを含むように調整し、適当な防腐剤および安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、百日せきワクチン-LTB経鼻投与剤を調製した。本品は10℃以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製した百日せきワクチン13μg蛋白質窒素20μlに、LTBおよびCTBを添加し、マウスの鼻腔内に接種し、さらに4週後に同量のワクチンを追加接種し、抗体産生を調べた。

この成績から、百日せきワクチンのみを接種されたマウスでは、抗PT抗体は、4.2国際単位以下であったのに対し、LTBを添加したものでは、150.3単位、LTBを添加したものでは230.5単位と上昇した。抗FHA抗体では、ワクチンのみ、LTB添加、LTB添加でそれぞれ2.3単位以下

、30.0単位以下、40.5単位であり、LTBあるいはLTBを添加したものは、ワクチンのみを接種した場合に比べ、著しく抗体産生が増強された。

百日せきワクチンにLTBおよびLTBを添加したときの抗体産生の増強

検 体	抗 体 価	
	抗 P T	抗 F H A
L T	230.5	40.5
L T B	150.3	30.0
無添加	< 4.2	< 2.3

抗体価はマウス5頭の平均値

抗体価はELISA国際単位

実施例 14

百日せき・ジフテリア・破傷風混合ワクチン

LTB製剤(点鼻剤)の調製:

百日せき・ジフテリア・破傷風混合ワクチンとリン酸緩衝液食塩水に溶解し無菌濾過したLTBとを混合し、20μl中に混合ワクチン50μg蛋白質窒素とLTBを2.5~250μgを含むように調整し、適当な防腐剤および安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、百日せき-LTB経鼻投与剤を調製した。本品は10℃以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製した百日せき・ジフテリア・破傷風混合ワクチンにLTBを添加し、マウスの鼻腔内に接種し、さらに4週後に同量のワクチンを追加接種し、抗体産生を調べた。

この成績から、百日せき・ジフテリア・破傷風混合ワクチンのみを接種されたものでは、抗百日せきトキシン(PT)抗体は、1.8国際単位以下、抗ジフテリアトキソイド(DT)抗体は、1.4単位以下、抗破傷風トキソイド(TT)は1.2単位以下であったのに対し、LTBを添加したものではそれぞ

れ、140.0、80.5、100.5単位と、LTBを添加したものはワクチンのものに比べ、抗体産生が増強された。

百日せき・ジフテリア・破傷風混合ワクチンにLTBを添加したときの抗体産生の増強

抗原：接種量	L T B	抗体産生 E L I S A 価
百日せきワクチン 14 $\mu$ g	5 $\mu$ g	140.0
ジフテリアトキソ イド 16 $\mu$ g		80.5
破傷風トキソイド 15 $\mu$ g		100.2
百日せきワクチン 14 $\mu$ g	0 $\mu$ g	<1.8
ジフテリアトキソ イド 16 $\mu$ g		<1.4
破傷風トキソイド 15 $\mu$ g		<1.2

抗体価はマウス5頭の平均値

抗体価はE L I S A 国際単位

風しんワクチンにL T Bを添加したときの抗体  
産生の増強

接 種 量		抗体産生 E L I S A 価
抗 原	L T B	
風しんワクチン 3 $\mu$ g	5 $\mu$ g	0.854
対 照 3 $\mu$ g	0 $\mu$ g	0.133

実施例 16

麻しんワクチン-L T B製剤(点鼻剤)の調製

麻しんワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過したL T Bとを混合し、20  $\mu$ g中に麻しんワクチン20  $\mu$ g相当量のウイルス粒子と、L T Bを5  $\mu$ gを含むように調製し、適当な安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、麻しんワクチン-L T B点鼻剤を調製した。本品は10℃以下の冷蔵所に

実施例 15

風しんワクチン-L T B製剤(点鼻剤)の調製

風しんワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過したL T Bとを混合し、20  $\mu$ g中にワクチン3  $\mu$ g相当量のウイルス粒子と、L T Bを5  $\mu$ gを含むように調製し、適当な安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、ワクチン-L T B点鼻剤を調製した。本品は10℃以下の冷蔵所に保存する。

上記のように調製した風しんワクチンおよびL T Bを3週間隔で2回マウスに投与し、血中の抗体産生をみた。

その成績からワクチンのみを投与した場合に産生されるE L I S A抗体価は0.133であったのに対し、L T B添加ワクチンは、0.854以上であり、L T Bを添加した場合は、ワクチンのみを接種した場合より著しく抗体産生を増強した。

保存する。

上記のように調製した麻しんワクチンおよびL T Bを3週間隔で2回マウスに投与し、血中の抗体産生をみた。

その成績から麻しんワクチンのみを投与した場合に産生されるE L I S A抗体価は、0.182であったのに対し、L T B添加ワクチンは、0.332以上であり、L T Bを添加した場合は、ワクチンのみを接種した場合より著しく抗体産生を増強した。

麻しんワクチンにL T Bを添加したときの抗体  
産生の増強

接 種 量		抗体産生 E L I S A 価
抗 原	L T B	
麻しんワクチン20 $\mu$ g	5 $\mu$ g	0.332
対 照 20 $\mu$ g	0 $\mu$ g	0.182

おたふくかぜワクチン-L.T.B.製剤(点鼻剤)の調製:

おたふくかぜワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過したL.T.B.とを混合し、20 $\mu$ l中にワクチン20 $\mu$ g相当量のウイルス粒子と、L.T.B.を5 $\mu$ gを含むように調製し、適当な安定剤を加え、適当な容器に適量分注し、ワクチン-L.T.B.点鼻製剤を調製した。本品は10℃以下の冷蔵所に保存する。

上記のように調製したワクチンおよびL.T.B.を3週間隔で2回マウスに投与し、血中の抗体産生をみた。

その成績からワクチンのみを投与した場合に産生されるELISA抗体価は0.023であったのに対し、L.T.B.添加ワクチンは、0.074以上であり、L.T.B.を添加した場合は、ワクチンのみを接種した場合より著しく抗体産生を増強した。

抗体産生の増強

接 種 量		抗体産生 ELISA価
抗 原	L.T.B.	
おたふくかぜ ワクチン 20 $\mu$ g	5 $\mu$ g	0.074
対 照 20 $\mu$ g	0 $\mu$ g	0.023

実験例 1B麻しん・風しん・おたふくかぜ混合ワクチン-L.T.B.製剤(点鼻剤)の調製:

麻しん・風しん・おたふくかぜ混合ワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過したL.T.B.とを混合し、20 $\mu$ l中に各々のワクチン7 $\mu$ g、1 $\mu$ g、7 $\mu$ g相当量のウイルス粒子と、L.T.B.を5 $\mu$ g含むように調製し、適当な安定剤を加え、適当な容

器に適量分注して、ワクチン-L.T.B.点鼻製剤を調製した。本品は10℃以下の冷蔵所に保存する。

上記のように調製したワクチンおよびL.T.B.を3週間隔で2回マウスに投与し、血中の抗体産生をみた。

その成績からワクチンのみを投与した場合に産生されるELISA抗体価は、麻しん、風しん、おたふくかぜの各々は、0.18、0.07、0.13であったのに対し、L.T.B.添加ワクチンは、各々0.34、0.27、0.28以上であり、L.T.B.を添加した場合は、ワクチンのみを接種した場合より著しく抗体産生を増強した。

麻しん・風しん・おたふくかぜ混合ワクチンにL.T.B.を添加したときの抗体産生の増強

接 種 量		抗体産生 ELISA価
抗 原	L.T.B.	
麻しんワクチン 7 $\mu$ g	5 $\mu$ g	麻しん 0.34
風しんワクチン 1 $\mu$ g		風しん 0.27
おたふくかぜ ワクチン7 $\mu$ g		おたふく 0.28
対 照	0 $\mu$ g	麻しん 0.18
		風しん 0.07
		おたふく 0.13

## 実施例 19

## ロタワクチン-ＬＴＢ製剤（経口、点鼻剤）の調製：

ロタワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過したＬＴＢと混合し、 $20\mu\text{g}$ 中にワクチン $3.3\mu\text{g}$ 相当量のウイルス粒子とＬＴＢを含むように調製し、適当な安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、ワクチン-ＬＴＢ経口、点鼻製剤を調製した。本品は、 $10^\circ\text{C}$ 以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製したワクチンおよびＬＴＢを3週間隔で2回マウスに投与し、血中の抗体産生をみた。

その成績から、ワクチンのみを投与した場合に産生されるＥＬＩＳＡ抗体価は、点鼻接種の場合は $0.063$ であったのに対し、ＬＴＢ添加ワクチンは、 $0.348$ 以上であり、経口接種の場合は $0.024$ であったのに対し、ＬＴＢ添加ワクチンは $0.177$ であり、ＬＴＢを添加した場合は、ワクチンのみを接種した場合より著しく抗体産生を増強した。

## ロタワクチンにＬＴＢを混合したときの抗体産生の増強

接 種 量				抗体産生	
抗 原			ＬＴＢ	ELISA 価	
ロ タ ワ ク チ ン	点 鼻 接 種	ワクチン	$3.3\mu\text{g}$	$5\mu\text{g}$	$0.348$
		対照	$3.3\mu\text{g}$	$0\mu\text{g}$	$0.063$
	経 口 接 種	ワクチン	$3.3\mu\text{g}$	$5\mu\text{g}$	$0.177$
		対照	$3.3\mu\text{g}$	$0\mu\text{g}$	$0.024$

## 実施例 20

## マイコプラズマワクチン-ＬＴＢ製剤（注射剤）の調製：

マイコプラズマワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過したＬＴＢとを混合し、 $1\text{ml}$ 中にワクチン $2.0 \times 10^{11}\text{CFU}$ （コロニー形成単位）相当量のマイコプラズマと、ＬＴＢを $10\mu\text{g}$ を含むように調製し、適当な安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、ワクチン-ＬＴＢ注射製剤を調製した。本品は $10^\circ\text{C}$ 以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製したワクチンおよびＬＴＢを2週間隔で3回ニワトリに投与し、マイコプラズマ感染攻撃後病変をみた。

その成績からマイコプラズマワクチンのみを投与した場合に比べ、ＬＴＢ添加ワクチンは、ワクチンのみを接種した場合より著しく防衛効果を示した。

## マイコプラズマワクチンにＬＴＢを添加したときの攻撃に対する病変の減少

接 種 量			病 変	
抗 原		ＬＴＢ		
全面体 ***			*	**
$1.0 \times 10^{11}\text{CFU}$		$5\mu\text{g}$	3/12	1.23
超音波処理				
$1.0 \times 10^{11}\text{CFU}$		$5\mu\text{g}$	2/11	1.27
対照				
$1.0 \times 10^{11}\text{CFU}$		$0\mu\text{g}$	10/10	2.77

\* : 分母は被検動物数、分子は病変を認めたもの

\*\* : 被検各群の病変の平均値

\*\*\* : コロニー形成単位

4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明のワクチン製剤投与後の一次抗体  
産生応答の経過を示し、

第2図は本発明のワクチン製剤投与による肺内ウ  
イルス感染数の変動を示す。

手続補正書

平成1年12月15日

特許庁長官 殿

1. 事件の表示

平成1年 特許願 第6759号

2. 発明の名称

ワクチン製剤

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 東京都港区白金5丁目9番1号

名称 北里研究所(社団法人)

代表者 水之江 公英

(ほか1名)

4. 代理人 〒170

東京都豊島区北大塚2-25-1

太陽生命大塚ビル3階 電話(917)1917

(7528)弁理士 小林 和憲

(ほか1名)

特許庁

1.12.18

方式  
照査

5. 補正命令の日付

平成1年11月20日

平成1年12月 5日(発送日)

6. 補正の対象

平成1年3月3日付提出の手続補正書の補正の  
対象の欄

7. 補正の内容

別紙のとおり

手続補正書

平成1年 3月 3日

特許庁長官 殿

1. 事件の表示

平成1年 特許願 第6759号

2. 発明の名称

ワクチン製剤

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 東京都港区白金5丁目9番1号

名称 北里研究所(社団法人)

代表者 水之江 公英

4. 代理人 〒170

東京都豊島区北大塚2-25-1

太陽生命大塚ビル3階 電話(917)1917

(7528)弁理士 小林 和憲

(ほか1名)

5. 補正命令の日付  
自発
6. 補正の対象  
明細書の全文